



TESIS DOCTORAL

**Efecto del deshojado precoz sobre la calidad
de uvas y vinos del cv. Tempranillo en
condiciones de clima semiárido.**

Daniel Moreno Cardona

Programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos

2019



TESIS DOCTORAL

**Efecto del deshojado precoz sobre la calidad
de uvas y vinos del cv. Tempranillo en
condiciones de clima semiárido.**

Daniel Moreno Cardona

Programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos

Conformidad de los directores:

Fdo.: Dra. M^a Esperanza Valdés Sánchez

Fdo.: Dra. Mar Vilanova de la Torre

2019



CENTRO DE **INVESTIGACIONES**
CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS
DE EXTREMADURA

Para la realización de este trabajo se ha contado con el apoyo institucional del proyecto del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) “Riego deficitario y otras prácticas de cultivo en la vid cv. Tempranillo en Extremadura” (RTA2008-00037-C4-00).

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directoras de tesis, la Dra. M. Esperanza Valdés Sánchez, coordinadora del Departamento de Enología del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX-INTAEX), y a la Dra. Mar Vilanova de la Torre, investigadora de la Misión Biológica de Galicia, centro perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), por su disposición, dedicación y orientación en la realización de esta Tesis.

Nuevamente, a la Dra. Esperanza Valdés Sánchez, por la confianza depositada en mí desde el primer momento en el que comencé a trabajar a su lado, por ser un ejemplo de dedicación al trabajo y por ser capaz de transmitir su pasión por la investigación y que espero que siga haciendo por mucho tiempo, ya que como se suele decir “la esperanza es lo último que se pierde”.

Reiterar mi gratitud a la Dra. Mar Vilanova por haber aceptado este reto a pesar de la distancia que nos separa y compartir su gran experiencia como investigadora, que sin duda ha enriquecido mi espíritu científico.

A mis compañeras del laboratorio, Balbi, ejemplo de fortaleza y Nuria, la exactitud personificada, que han estado siempre al pie del cañón, apoyándome y realizando una labor imprescible para el desarrollo de este trabajo, sin olvidarme de Raquel, que siempre estaba dispuesta a compartir conmigo su extenso conocimiento en las artes del laboratorio, así como del resto de compañer@s del INTAEX por su apoyo y por haberme acogido en esta gran familia. A Samuel y al resto de personas que han pasado por el laboratorio a lo largo de estos años y que han aportado su granito de arena al desarrollo de esta Tesis.

A Esther, puro nervio científico, e Inma, emprendedora por naturaleza, por compartir tantos buenos momentos en el despacho mientras tratábamos de poner en orden nuestros pensamientos, y porque las elaboraciones en la planta piloto ya no son lo mismo sin vosotras... También al resto de miembros del “cuartel general”.

Quiero manifestar mi agradecimiento a mis compañeros de la viña, David, Luis y Henar por haber tratado a las uvas con tanto mimo y porque todo lo que se de este

maravilloso cultivo me lo habéis enseñado vosotros, y todo ello siempre con la mejor de vuestras sonrisas.

A la Dra. M^a de Guía Córdoba Ramos, por ofrecerme su ayuda de manera desinteresada en momentos difíciles.

A mis grandes amigos y compañeros de batalla Rubén y Ángel, ya que, sin su apoyo, seguramente no habría llegado hasta donde estoy ahora mismo.

A mi padre, Antonio, por estar siempre a mi lado y por ser mi ejemplo a seguir, orgulloso siempre de ti. A mi madre, Elena, porque es la estrella que siempre guiará mi camino y por ser la persona que me mostró que rendirse no es una opción, siempre se debe luchar hasta el final. Gracias por vuestro cariño y por haberme dado todo y haber hecho de mi lo que soy. A mis hermanos, José y Juan por su apoyo incondicional.

Por último, quiero dar las gracias a Isa, mi compañera, mi amiga y mi vida, por enseñarme siempre el lado positivo de las cosas y permanecer siempre a mi lado. A Mario y Guillermo por ser el motor que mueve mi vida.

A todos ellos, ¡mil gracias!



ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN/ABSTRAC	I
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. La vitivinicultura en Extremadura.....	1
1.2. Composición de la uva y del vino.....	5
<i>1.2.1. Azúcares, ácidos orgánicos y sustancias minerales.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2. Los compuestos fenólicos</i>	<i>7</i>
<i>1.2.2.1. Compuestos fenólicos no flavonoideos.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.2.2. Compuestos fenólicos flavonoideos.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.2.3. Reacciones de copigmentación.....</i>	<i>12</i>
1.2.3. Las sustancias nitrogenadas.....	13
<i>1.2.3.1. Compuestos nitrogenados inorgánicos</i>	<i>13</i>
<i>1.2.3.2. Compuestos nitrogenados orgánicos</i>	<i>14</i>
<i>1.2.3.3. Índices nitrogenados</i>	<i>17</i>
1.2.4. Los compuestos aromáticos	18
<i>1.2.4.1. Aroma varietal o primario</i>	<i>18</i>
<i>1.2.4.2. Aroma de origen pre-fermentativo</i>	<i>19</i>
<i>1.2.4.3. Aroma de origen fermentativo.....</i>	<i>19</i>
<i>1.2.4.4. Aroma de origen post-fermentativo.....</i>	<i>21</i>
1.2.5. Evolución de la composición de la uva durante el proceso de maduración. 21	
<i>1.2.5.1. Evolución de azúcares y ácidos. Madurez tecnológica.....</i>	<i>22</i>
<i>1.2.5.2. Evolución de compuestos fenólicos. Madurez fenólica.....</i>	<i>23</i>
<i>1.2.5.3. Madurez aromática</i>	<i>25</i>
<i>1.2.5.4. Evolución de compuestos nitrogenados</i>	<i>26</i>
1.3. El clima y la calidad de la uva y el vino.....	27
<i>1.3.1. Temperatura.....</i>	<i>27</i>
<i>1.3.2. Precipitaciones</i>	<i>28</i>
<i>1.3.3. Radiación.....</i>	<i>30</i>
<i>1.3.4. El clima de Extremadura.....</i>	<i>32</i>
1.4. Técnicas de control de la producción del viñedo.....	32
1.5. Efecto del deshojado precoz sobre la producción y la composición de la uva y vino.....	34

1.6. La variedad Tempranillo.....	36
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1. Viñedo experimental. Características edafoclimáticas	47
3.1.1. Localización y temporalidad del ensayo. Material vegetal.....	47
3.1.2. Caracterización climática	48
3.1.3. Características edafológicas	51
3.2. Diseño experimental y tratamientos aplicados	52
3.3. Evaluación de parámetros agronómicos	56
3.3.1. Evolución del desarrollo vegetativo y determinación del área foliar total media	56
3.3.2. Determinación del área foliar eliminada	56
3.3.3. Número de botones florales por inflorescencia	57
3.3.4. Tasa de cuajado de baya	58
3.3.5. Componentes de la producción	58
3.4. Composición y características físico-químicas de la uva	58
3.4.1. Muestreo de uvas.....	58
3.4.2. Determinación de la composición físico-química de las uvas durante la maduración	58
3.4.2.1. Análisis de parámetros indicadores de la madurez tecnológica.....	60
3.4.2.2. Análisis de parámetros indicadores de la madurez fenólica	60
3.4.3. Composición nitrogenada de la uva. Determinación de aminoácidos libres y amonio.....	62
3.4.4. Determinación de la composición polifenólica de los hollejos de las uvas. .	66
3.5. Vinificaciones experimentales	71
3.6. Análisis de los mostos y vinos	73
3.6.1. Parámetros enológicos generales	73
3.6.2. Composición fenólica y características cromáticas de los vinos.....	73
3.6.3. Composición aromática del vino	74
3.6.4. Valor de la actividad odorífera	77
3.6.5. Análisis organoléptico del vino	77
3.7. Análisis estadístico	79

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
4.1. Efecto del deshojado precoz sobre el desarrollo vegetativo y productivo de la cepa y las características de la uva.....	83
<i>4.1.1. Condiciones climáticas de los años 2009-2011.....</i>	<i>83</i>
<i>4.1.2. Desarrollo vegetativo y componentes de la producción.....</i>	<i>85</i>
<i>4.1.2.1. Análisis de componentes principales (ACP) de los componentes de la producción.....</i>	<i>90</i>
<i>4.1.3. Efecto del deshojado precoz sobre la evolución de las características físico-químicas de las uvas durante el período de la maduración</i>	<i>91</i>
<i>4.1.4. Efecto del deshojado precoz sobre la composición físico-química de la uva en el momento de vendimia.....</i>	<i>102</i>
<i>4.1.4.1. Análisis de componentes principales (ACP) de la composición de la baya en vendimia</i>	<i>105</i>
4.2. Efecto del deshojado precoz sobre la composición nitrogenada de la uva.....	114
<i>4.2.1. Índices nitrogenados y familias aminoacídicas</i>	<i>114</i>
<i>4.2.2. Perfil aminoacídico.....</i>	<i>118</i>
<i>4.2.3. Relación entre el contenido nitrogenado de las uvas y los parámetros agronómicos del cv. Tempranillo.....</i>	<i>124</i>
<i>4.2.3.1. Análisis de componentes principales (ACP) de los parámetros agronómicos y del perfil aminoacídico de las bayas</i>	<i>131</i>
4.3. Influencia del deshojado precoz sobre composición fenólica total de hollejos de uva del cv. Tempranillo.....	134
<i>4.3.1. Efecto del deshojado precoz sobre la concentración de antocianos de hollejos de la baya</i>	<i>135</i>
<i>4.3.2. Efecto del deshojado precoz sobre la concentración de flavanoles en hollejos de uva.</i>	<i>138</i>
<i>4.3.3. Efecto del deshojado precoz sobre la concentración de flavonoles en hollejos de uva.</i>	<i>139</i>
<i>4.3.4. Concentraciones de ácidos hidroxicinámicos y estilbenos en hollejos de uva</i>	<i>140</i>
4.4. Influencia del deshojado precoz en la composición y calidad de los vinos ..	142
<i>4.4.1. Composición físico-química de los vinos</i>	<i>142</i>
<i>4.4.2. Efecto del deshojado precoz sobre la composición volátil de los vinos.....</i>	<i>147</i>
<i>4.4.2.1. Análisis de componentes principales (ACP) de la composición volátil de los vinos.....</i>	<i>155</i>
<i>4.4.3. Valor de Actividad Odorífera de vinos Tempranillo procedentes de cepas control y deshojadas</i>	<i>157</i>

4.4.4. <i>Influencia del deshojado precoz sobre las características sensoriales de los vinos</i>	158
5. CONCLUSIONES	167
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171
7. ANEXOS	209

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Variedades de vid predominantes en las diferentes subzonas de la D.O. Ribera del Guadiana.	3
Tabla 1.2. Localización, concentración, propiedades sensoriales y principal interés enológico de los compuestos fenólicos de las bayas.	9
Tabla 1.3. Clasificación de los aminoácidos en función de su precursor biosintético común.	14

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Estados fenológicos expresados en días del calendario juliano (día del año, DDA).	48
Tabla 3.2. Datos climáticos registrados en el viñedo experimental del cv. Tempranillo correspondientes al periodo vegetativo-productivo (V-P, abril a septiembre) y anuales durante los años 2009-2011. Datos climáticos del periodo 2004-2011.	49
Tabla 3.3. Caracterización edafológica del viñedo experimental del cv. Tempranillo.	52
Tabla 3.4. Volumen de agua de riego aplicado, período de riego y fechas de aplicación del deshojado y de vendimia de los diferentes tratamientos experimentales (campañas 2009-2011) expresados en días del calendario juliano (día del año, DDA).	55
Tabla 3.5. Correlación obtenida entre el peso de hoja y el área foliar durante las campañas 2009-2011.	56
Tabla 3.6. Correlación lineal obtenida entre el número de botones florales contados a partir de la fotografía (BFF) y el número de botones florales reales de la inflorescencia (BFR) en el cv. Tempranillo durante las campañas 2009-2011.	57
Tabla 3.7. Rectas de calibración obtenidas para el cálculo de la concentración de fenoles totales, antocianos y taninos.	61
Tabla 3.8. Aminoácidos y amonio analizados en mostos de uvas del cv. Tempranillo. Longitud de onda, tiempos de retención y patrones empleados para su detección y cuantificación mediante HPLC.	64
Tabla 3.8. Continuación.	65
Tabla 3.9. Compuestos fenólicos analizados en hollejos de uva del cv. Tempranillo. Longitud de onda, tiempos de retención y patrones utilizados para su detección y cuantificación mediante HPLC.	69
Tabla 3.9. Continuación.	70
Tabla 3.10. Compuestos volátiles identificados y cuantificados en los vinos del cv. Tempranillo.	76

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.1. Índices bioclimáticos correspondientes a los años 2009, 2010 y 2011 en la zona del viñedo experimental del cv. Tempranillo.....	85
Tabla 4.2. Área foliar existente en el momento en el que se efectuó el deshojado (AFTi), área foliar eliminada (AFE) y área foliar total media en el periodo de envero a vendimia (AFTm) de las cepas del tratamiento (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) del cv. Tempranillo (campañas 2009-2011).....	86
Tabla 4.3. Número de flores por racimo y tasa de cuajado (%) determinados en las cepas de los tratamientos (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) del cv. Tempranillo (campañas 2009-2011)	87
Tabla 4.4. Componentes de la producción y ratio área foliar total media/producción (AFTm/P) en cepas del cv. Tempranillo (campañas 2009-2011) a partir del tratamiento (Tr) control (C) y de deshojado precoz (ED).	88
Tabla 4.5. Composición físico-química de las uvas del cv. Tempranillo con similar concentración de sólidos solubles totales. (campañas 2009-2011) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).	103
Tabla 4.6. Composición físico-química de los mostos del cv. Tempranillo (campañas 2009-2011) elaborados a partir de las uvas del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).	104
Tabla 4.7. Concentración de aminoácidos identificados en uvas del cv. Tempranillo (campañas 2009-2011) Tempranillo procedentes del tratamiento (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) en los correspondientes momentos de vendimia C y ED de las campañas 2009-2011.	119
Tabla 4.7. Continuación.....	120
Tabla. 4.8. Coeficientes de correlación de Pearson (<i>r</i>) y significancia entre parámetros agronómicos y relativos al crecimiento vegetativo de las cepas y el contenido nitrogenado de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamientos control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED de las campañas 2009-2011.	125
Tabla 4.9. Parámetros de las regresiones lineales entre AFT _m y el contenido nitrogenado de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).	126
Tabla 4.10. Parámetros de las regresiones lineales entre AFT _m /P y el contenido nitrogenado de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).	129
Tabla 4.11. Concentración de antocianinas (mg/kg peso fresco de uva) en los hollejos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009 y 2010)...	136

Tabla 4.12. Concentración de flavanoles (mg/kg peso fresco de uva) en los hollejos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009 y 2010)...	138
Tabla 4.13. Concentración de flavonoles (mg/kg peso fresco de uva) en los hollejos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamientos control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009 y 2010)...	139
Tabla 4.14. Concentración de ácidos hidroxicinámicos y estilbenos (mg/kg peso fresco de uva) en los hollejos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamientos control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009 y 2010).....	140
Tabla 4.15. Composición físico-química de los vinos del cv. Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2009-2011).	143
Tabla 4.16. Composición fenólica y cromática de los vinos del cv.Tempranillo (campañas 2009-2011) elaborados a partir de las uvas del tratamientos (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED).	146
Tabla 4.17. Compuestos volátiles de los vinos del cv.Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamientos (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2009-2011).....	151
Tabla 4.17. Continuación.....	152
Tabla 4.18. Valores de Actividad Odorífera (VAO) en vinos del cv Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) (media de las campañas 2009-2011).....	157

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Mapa de las subzonas pertenecientes a la D.O. Ribera del Guadiana. 3

Figura 1.2. Representación esquemática de la constitución de la baya. Composición de las diferentes partes. 6

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1. Datos pluviométricos y termométricos (máximos, medios y mínimos) registrados en la estación meteorológica situada en el viñedo experimental durante los años 2009-2011. 48

Figura 3.2. Detalle de cepas deshojadas al comienzo de la floración en el viñedo experimental cv. Tempranillo..... 53

Figura 3.3. Diseño experimental de los tratamientos llevados a cabo en el viñedo experimental del cv. Tempranillo durante las campañas 2009-2011. 54

Figura 3.4. Racimo en estado fenológico de prefloración a) Tratamiento control (C); b) Tratamiento deshojado precoz (ED). 57

Figura 3.5. Esquema de procesado y análisis realizados para la determinación de la composición de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control y deshojado precoz. 59

Figura 3.6. Esquema de microvinificación. 72

Figura 3.7. Ficha utilizada en el análisis sensorial de los vinos del cv. Tempranillo.... 78

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 4.1. Análisis de componentes principales (ACP) realizado con los valores medios del número de flores por racimo, tasa de cuajado y de los componentes del rendimiento de cepas del cv. Tempranillo del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) durante las campañas 2009-2011..... 91

Figura 4.2. Valores de los parámetros de madurez tecnológica de las uvas del cv. Tempranillo (campaña 2009) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED). 93

Figura 4.3. Valores de los parámetros de madurez fenólica del cv. Tempranillo (campaña 2009) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED). 95

Figura 4.4. Valores de los parámetros de la madurez tecnológica de las uvas del cv. Tempranillo (campaña 2010) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED). 97

Figura 4.5. Valores de los parámetros de madurez fenólica de las uvas del cv. Tempranillo (campaña 2010) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).	98
Figura 4.6. Valores de los parámetros estimadores de la madurez tecnológica en las uvas del cv. Tempranillo (campaña 2011) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).	100
Figura 4.7. Valores de los parámetros de la madurez fenólica en las uvas del cv. Tempranillo (campaña 2011) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).	101
Figura 4.8. Análisis de componentes principales (ACP) realizado con los valores medios de los parámetros enológicos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED). en el momento de la vendimia ED (campañs 2009-2011).	106
Figura 4.9. Análisis de componentes principales (ACP) realizado con los valores medios de los parámetros enológicos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED). en el momento de la vendimia C (campañs 2009-2011).	107
Figura 4.10. Análisis de componentes principales (ACP) realizado con los valores medios de los parámetros enológicos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes de los tratamientos de deshojado (ED) y control (C) con uvas de similar contenido en sólidos solubles totales (campañs 2009-2011).	108
Figura 4.11. Concentración de los índices nitrogenados (mgN/L) de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañs 2009-2011).	115
Figura 4.12. Concentración de las familias aminoacídicas (mgN/L) de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamientos (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) en los correspondientes momentos de vendimia C y ED (campañs 2009-2011).	117
Figura 4.13. Representación gráfica de las relaciones lineales entre AFT_m y el contenido de FAN, AAA-N, YAN, PAN y AMM de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañs 2009-2011).	127
Figura 4.14. Representación gráfica de las relaciones lineales entre AFT_m y el contenido de las familias aminoacídicas de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañs 2009-2011).	128
Figura 4.15. Representación gráfica de las relaciones lineales entre AFT_m/P y el contenido de FAN, AAA-N, YAN, PAN y AMM de las uvas cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañs 2009-2011).	130

Figura 4.16. Representación gráfica de las relaciones lineales entre AFT_m/P y el contenido de las familias aminoacídicas de las uvas cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).....	131
Figura 4.17. Análisis de componentes principales (ACP) aplicado a las familias aminoacídicas, índices nitrogenados y parámetros agronómicos de las uvas cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).	133
Figura 4.18. Composición fenólica (mg/kg peso fresco de uva) de los hollejos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de Vendimia C y ED (campañas 2009 y 2010).	134
Figura 4.19. Composición volátil ($\mu\text{g/L}$) de los vinos del cv. Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2009-2011).	148
Figura 4.20 Análisis de componentes principales (ACP) aplicado a las familias de compuestos volátiles de los vinos del cv. Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2009-2011).....	156
Figura 4.21. Perfil sensorial visual de los vinos del cv. Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2010-2011).	159
Figura 4.22. Perfil sensorial olfativo de los vinos del cv. Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2010-2011).	161
Figura 4.23. Perfil sensorial gustativo de los vinos del cv. Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2010-2011).....	163

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Integral térmica eficaz (ITE).....	50
Ecuación 2. Índice heliotérmico (HI).	50
Ecuación 3. Índice de sequía (DI).....	51
Ecuación 4. Potencial fenólico total (PPT).....	61
Ecuación 5. Contenido antociánico total (AnT)	61
Ecuación 6. Contenido de taninos totales (TnT)	62
Ecuación 7. Nitrógeno aminoacídico asimilable (AAA-N).....	66
Ecuación 8. Nitrógeno asimilable por las levaduras (YAN)	66
Ecuación 9. Antocianos copigmentados (AC).....	74

I

**RESUMEN
ABSTRAC**

I. RESUMEN

Esta Tesis se enmarca en el proyecto de investigación “Riego deficitario y otras prácticas de cultivo en la vid cv. Tempranillo en Extremadura. Proyecto INIA RTA 2008-00037-C04-03”, en el que se ha estudiado la incidencia del deshojado precoz sobre las características de las uvas, mostos y vinos, durante las campañas 2009-2011.

El deshojado precoz es una práctica cultural aplicada en el viñedo cuyo objetivo principal es regular el nivel de carga de cosecha y mejorar las condiciones microclimáticas en viñedos vigorosos, al incrementar la aireación y la exposición a la luz solar de los racimos, con beneficios demostrados sobre la calidad de uvas y vinos.

En este trabajo, los tratamientos analizados fueron deshojado justo antes de floración (ED) y cepas control (C) en un viñedo experimental del cv. Tempranillo sometido a un régimen hídrico del 100 % de la evapotranspiración del cultivo (ETc).

Se ha estudiado el efecto del deshojado precoz sobre el desarrollo vegetativo de las cepas y sobre la evolución de la composición de la baya durante su ciclo de maduración (azúcares, ácidos, compuestos fenólicos y potasio). En vendimia se ha analizado la incidencia de esta técnica vitícola sobre los componentes del rendimiento y la composición físico-química de las bayas (azúcares, ácidos, compuestos fenólicos de uva, perfil fenólico de hollejos y compuestos nitrogenados) y en los vinos elaborados se ha determinado su incidencia sobre los parámetros generales, fenólicos, cromáticos la composición volátil y las características sensoriales.

El deshojado precoz, provocó una tendencia a la reducción del área foliar total media de las cepas, aunque dicho efecto dependió del año estudiado. Por otra parte, hay que señalar que en el año 2010, año en el que se registró un mayor volumen de precipitaciones y en el que la aplicación del deshojado fue más intensa, las cepas mostraron un crecimiento vegetativo compensatorio. En los años 2010 y 2011, la producción de las cepas a las que se aplicó el deshojado precoz fue menor que en las cepas control debido a que esta técnica provocó una reducción de la tasa de cuajado.

Los resultados han mostrado que el deshojado precoz provocó un adelanto de la maduración de las uvas, con el incremento de la concentración de los sólidos solubles totales y del pH y la disminución en la acidez titulable respecto del control.

En cuanto a los hollejos, los procedentes de las uvas ED mostraron una mayor concentración de flavonoles, compuestos que intervienen en las reacciones de copigmentación, los cuales son cruciales para la estabilidad de color del vino. Sin embargo, la aplicación del deshojado precoz no tuvo repercusión sobre el perfil de aminoácidos de las uvas ni tampoco en las concentraciones de estas sustancias.

Los efectos del deshojado precoz fueron más notables en los vinos elaborados, debido principalmente al incremento de los compuestos fenólicos y a los aumentos de la concentración de sustancias responsables de aromas frutales y florales observados en los vinos ED respecto de los C. Estos resultados, repercutieron en las características sensoriales de los vinos, de modo que los catadores puntuaron los vinos procedentes de cepas deshojadas con mayores valores de intensidad de color e intensidad de aroma frutal y menores valores de aroma herbáceo que los procedentes de las cepas control.

Los resultados obtenidos indican que, bajo las condiciones edafoclimáticas del presente estudio, el deshojado precoz puede convertirse en una herramienta útil para el control del rendimiento productivo de la vid, mejorando ciertas características físico-químicas de las uvas y, en consecuencia, mejorar el potencial enológico de los vinos de Tempranillo.

Abstrac

This Thesis is part of the research project "Deficit irrigation and other agronomical practices in the vine cv. Tempranillo in Extremadura, INIA RTA 2008-00037-C04-03" where the incidence of early defoliation on berry, must and wine composition during 2009-2011 seasons was evaluated.

Early leaf removal is a management technique applied to regulate crop load and improve fruit microclimate conditions in vigorous vineyards, increasing aeration and sunlight exposure in the cluster zone, with demonstrated benefits in grape and wine quality.

In this work, the treatments analyzed were defoliation carried out just before flowering (ED) and non-defoliated vines (C), in an experimental vineyard cv. Tempranillo irrigated with a 100 % of the crop evapotranspiration (ETc).

The effect of early defoliation on vine vegetative growth and on composition during berry ripening (sugars, acids and phenolic compounds) has been studied. At harvest, the incidence this technique on the yield components and berry physicochemical composition (sugars, acids, grape phenolic compounds, skin phenolic profile and nitrogen compounds) was studied. In the elaborated wines, the effect of the practice of early defoliation on its composition (standard, phenolic and chromatic parameters) as well as its volatile composition and its sensorial characteristics has been studied too.

Early leaf removal showed a trend to reduce the vine average total leaf area, although this effect depend on the year. In the other hand, in 2010, year in which the highest volume of rainfall was recorded and when the application of leaf removal was more intense, the vines showed compensatory vegetative growth. In 2010 and 2011, vine yield in ED treatment was lower than in the control vines because this technique reduced the fruit set rate.

The results showed that early defoliation led to an advanced grape ripening, increasing the soluble solids content and pH, as well as decreasing the acidity of ED treatments compared to C.

As for the berry skin phenolic profile, early leaf removal increased the concentration of flavonols, compounds involved in copigmentation reactions, which are crucial for wine colour stability. The berry amino acid profile did not affect by early defoliation.

The effects of early defoliation were more noticeable in elaborated wines, mainly due to the increase in phenolic compounds and the concentration of the aromatic compounds involved in the fruity and floral aromas observed in ED vs C treatment. These results had an impact on the sensory characteristics of the wines, obtaining wines of higher color intensity, with a higher fruity aroma and less herbaceous than the control wines.

The results obtained indicate that, under the conditions of the present study, early leaf removal can become a useful tool for controlling the productive yield of the vine, improving certain physical-chemical characteristics of the grapes and, consequently, improving the oenological potential of Tempranillo wines.

1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. La vitivinicultura en Extremadura

Extremadura, región situada en el suroeste de España, posee una importante tradición vitícola. Sus 81.218 hectáreas de viñedo representan aproximadamente el 8,4 % del total nacional ([MAPAMA, 2017a](#)). La producción de vinos y mostos en esta región ha experimentado un notable aumento durante los últimos años, con una producción media de unos 3,5 millones de hectolitros ([OIVE, 2017](#)). Además, la viticultura tiene un gran valor medioambiental, pues muchos de los viñedos extremeños están situados en terrenos pobres y secos en los que pocos cultivos son rentables y, por tanto, su desaparición supondría la desertización de numerosas zonas.

Los viñedos extremeños están ubicados en zonas de clima árido o semiárido, lo que tiene como consecuencia, sobre todo al final del verano, bajos contenidos de agua en el suelo. Esta circunstancia, sumada a la mayor demanda evapotranspirativa del cultivo durante esta época, se traduce en un déficit hídrico acusado en las plantas, que repercute en la producción y calidad de la uva y por tanto en los vinos. La Ley 8/1996 derogó el artículo 42 del "Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes" (Ley 25/72) por el que se prohibía el riego de la vid. A partir de entonces, la modernización del viñedo en Extremadura ha ido de la mano de la implantación de esta técnica.

Según el Reglamento (CE) n° 3255/94, las variedades de vid recomendadas y autorizadas para la obtención de vinos en la Comunidad de Extremadura son las siguientes:

- Recomendadas: Alarije, Borba, Cayetana Blanca, Garnacha Tinta, Pardina, Tempranillo y Viura.
- Autorizadas: Bobal, Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Chelva, Eva, Graciano, Malvar, Mazuelo, Merlot, Monastrell, Parellada, Pedro Ximenez, Shiraz y Verdejo.

Debido a los diferentes programas de reestructuración y reconversión del viñedo que comenzaron a partir de la campaña 2000/01, en la última década el viñedo extremeño ha experimentado una reconversión varietal. Si en el año 2000, las variedades tintas eran

prácticamente inexistentes, apenas llegaban a 3000 ha, en el 2014 superaban las 26.200 ha. Todo ello ha tenido como consecuencia un crecimiento en el volumen de vino tinto elaborado, cuya producción en la última década ha superado el millón de hectolitros. A modo de ejemplo, la producción en 2015/2016 de este tipo representó ya el 38 % del total de la producción regional de vino.

Extremadura ha sido tradicionalmente una región productora de vinos a granel. Esta situación ha ido cambiando hacia la producción de vinos embotellados con el consiguiente aumento del valor añadido del producto final. Esto es debido, entre otras causas, al establecimiento de la Denominación de Origen (D.O.) Ribera del Guadiana (Orden del 16 de abril de 1999, B.O.E. Núm. 105). Además, los vinos extremeños también pueden acogerse a la mención “vinos con indicación geográfica”. De modo que, en la actualidad, un 12 % de la producción total de vino de la Comunidad Autónoma de Extremadura, sale el mercado como vino con D.O., un 17 % como vinos con Indicación Geográfica Protegida (IGP) y el resto de la producción (> 69 %) se comercializan como vinos sin identificación geográfica.

La D.O. Ribera del Guadiana ampara seis subzonas o comarcas vitícolas extremeñas con características edafoclimatológicas muy diferentes. En la Figura 1.1 se muestran la localización geográfica de estas subzonas y en la Tabla 1.1 las variedades predominantes en cada una de ellas.



Figura 1.1. Mapa de las subzonas pertenecientes a la D.O. Ribera del Guadiana. Fuente <http://riberadelguadiana.eu>.

Tabla 1.1. Variedades de vid predominantes en las diferentes subzonas de la D.O. Ribera del Guadiana.

D.O. Ribera del Guadiana (Subzonas)	Variedades blancas	Variedades tintas
Tierra de Barros	Cayetana Blanca, Pardina, Montúa y Macabeo	Tempranillo, Garnacha y Cabernet Sauvignon
Matanegra	Eva o Beba de los Santos, Montúa Pardina, Cayetana Blanca y Macabeo	Tempranillo, Garnacha y Cabernet Sauvignon
Ribera Alta del Guadiana	Alarije y Borba	Tempranillo y Garnacha
Ribera Baja del Guadiana	Cayetana Blanca, Pardina y Macabeo	Tempranillo y Garnacha
Montánchez	Borba, Alarije, Cayetana Blanca y Pedro Ximénez.	Tempranillo y Garnacha
Cañamero	Alarije, Chelva y Malvar	Tempranillo y Garnacha

Tierra de Barros:

Situada en el centro y sureste de la provincia de Badajoz, es la comarca de mayor producción vitícola. Se trata de una zona de relieve prácticamente llano, con suelos fértiles, ricos en nutrientes y con notable capacidad de retención de agua. El clima es bastante seco, con elevadas temperaturas en verano, acentuadas por la acción del viento solano. Las precipitaciones anuales oscilan entre 350 y 400 mm.

Matanegra:

Situada al sur de la provincia de Badajoz, esta subzona presenta cierta similitud en sus condiciones edafoclimáticas con Tierra de Barros, aunque con temperaturas algo más suaves, lo cual genera un retraso en la fecha de vendimia.

Ribera Baja del Guadiana:

Esta comarca se ubica en los márgenes del río Guadiana, en su curso próximo a la frontera con Portugal. Los depósitos cuaternarios dejados por el Guadiana y sus afluentes han dado lugar a los terrenos que se conocen como *las Vegas Bajas*, cuyos suelos son de carácter arcilloso-limoso. El clima es continental con moderada influencia atlántica en el que la mayor persistencia e intensidad de las lluvias está condicionada por los vientos del Oeste y Suroeste. En esta zona, los veranos son largos, los otoños y las primaveras cortas y suaves, con concentraciones de lluvias principalmente durante dichas estaciones, e inviernos no muy rigurosos.

Ribera Alta del Guadiana:

Esta comarca también se localiza en zonas de las vegas del Guadiana, y se amplía a las tierras de La Serena y Campo de Castuera. Al igual que la anterior, como consecuencia de los depósitos cuaternarios dejados por el Guadiana y sus afluentes, sus suelos son muy arenosos.

Montánchez:

Situada al Sur de Cáceres, es una zona de complicada orografía, con abundantes cerros y pequeños valles en los que el viñedo aparece sobre suelos clasificados como tierras pardas ácidas. El clima es continental, con veranos muy cálidos e inviernos no demasiado rigurosos. Las precipitaciones se sitúan entre 500 y 600 mm al año.

Cañamero:

La mayor parte de esta comarca se encuentra situada en la Sierra de Guadalupe. Posee un relieve bastante accidentado, situándose los cultivos preferentemente en las laderas, a unos 600-800 m sobre el nivel del mar, sobre terrenos pobres y de naturaleza pizarrosa. El clima es suave, sin grandes contrastes térmicos, con precipitaciones de alrededor de 750-800 mm al año.

En base a todo lo anterior, puede decirse que la viticultura es un sector estratégico en Extremadura, no solo por la superficie cultivada y el volumen de producción que se alcanza, sino también por su valor económico, importancia social y significación ambiental. Sin embargo, el sector vitivinícola extremeño se enfrenta hoy a problemas de diferente tipo, entre los cuales, los derivados de su ubicación geográfica y sus condiciones edafoclimáticas ocupan un lugar esencial. Son necesarios estudios que aporten información básica para optimizar el manejo y gestión de la vid y así, poder reducir costes de cultivo y obtener cosechas con las características deseadas en función de su destino final.

La implantación del riego en el viñedo ha permitido utilizar técnicas de cultivo que pueden mejorar la eficacia y competitividad del sistema productivo: sistemas de conducción en espaldera, densidades de plantación más intensivas, y otras técnicas de cultivo que están ampliamente extendidas en otras zonas vitícolas, pero cuyos efectos sobre el comportamiento de las cepas en nuestras condiciones edafoclimáticas se desconoce. Entre esas técnicas de cultivo, el deshojado temprano, aplicado y desarrollado por primera vez por [Poni et al. \(2006\)](#) en el Norte de Italia, se ha mostrado como una herramienta clave en la mejora de la viticultura, con efectos positivos sobre los componentes de la producción y calidad de las variedades Tempranillo en la Rioja y Valencia y Albariño en Galicia ([Tardáguila et al., 2010](#); [Diago et al., 2012a](#); [Risco et al., 2014](#); [Otero, 2015](#)).

1.2. Composición de la uva y del vino

El fruto de la vid, la uva, está constituida por hollejo, pulpa y semillas. De la composición de cada una de estas partes va a depender, en gran medida, la calidad de los mostos y vinos elaborados a partir de la misma. Los principales componentes de la uva, agua, azúcares, ácidos orgánicos, sustancias minerales, compuestos nitrogenados, lípidos, compuestos aromáticos y compuestos fenólicos se distribuyen según se muestra en la Figura. 1.2 ([Ribéreau-Gayon et al., 2006](#)).

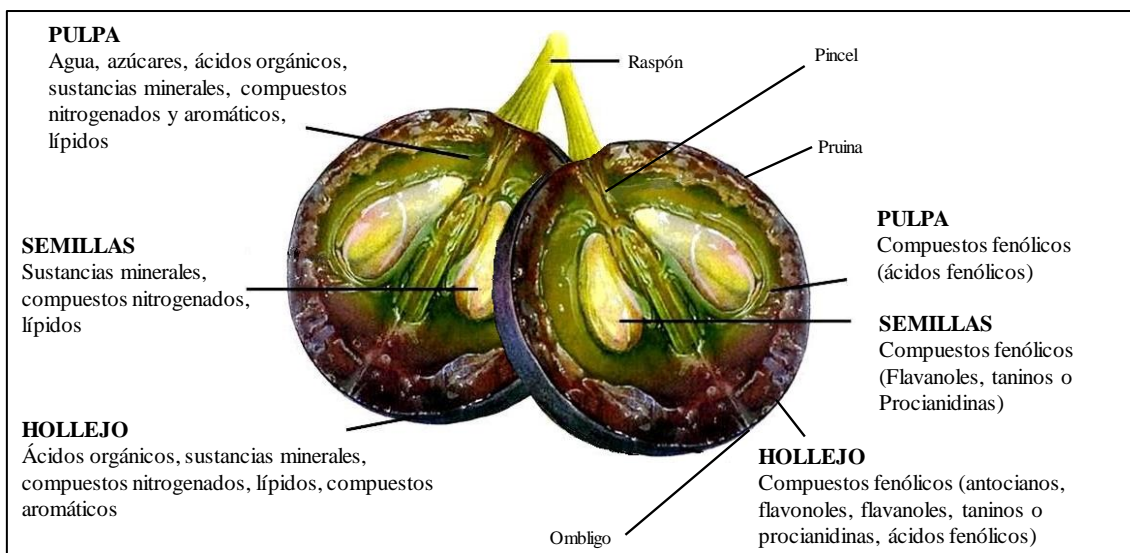


Figura 1.2. Representación esquemática de la constitución de la baya. Composición de las diferentes partes.

1.2.1. Azúcares, ácidos orgánicos y sustancias minerales

La pulpa, constituyente mayoritario de la baya, contiene principalmente agua y **azúcares** de los que el 95-99 % lo constituyen la glucosa y la fructosa que son transformadas por las levaduras en alcohol etílico y dióxido de carbono durante la fermentación alcohólica.

Junto a los azúcares, los **ácidos orgánicos** son los compuestos más abundantes de la pulpa. En las uvas maduras sanas, los ácidos más abundantes son los ácidos tartárico, málico y cítrico. El ácido tartárico existente en la uva es el isómero dextrógiro (ácido L-(+)-tartárico). Mientras que los ácidos málico y cítrico son muy comunes en el reino vegetal, el tartárico sólo se encuentra en un reducido número de especies vegetales, y la uva es uno de los pocos frutos que contiene cantidades importantes. En las uvas maduras, es el ácido mayoritario, con concentraciones que varían entre 3 y 9 g/L, y las del ácido málico entre 1 y 5 g/L. Del contenido de estos dos ácidos depende la acidez total de la uva, que suele oscilar entre los 4 y los 15 g/L, expresados en ácido tartárico. En lo que respecta a los valores del pH, cuyos límites se sitúan entre 2,8 y 3,5, dependen en gran medida de relación málico/tartárico y de la cantidad de cationes presentes en el mosto. (Keller, 2010).

Las **sustancias minerales** presentes en la pulpa proceden de la absorción por parte de las raíces o bien son subproductos de los procesos de respiración de los ácidos orgánicos.

La disponibilidad de agua por parte de la planta, las condiciones climáticas que intervienen en la transpiración y las propiedades del suelo (textura, contenido en materia orgánica, humedad y pH) son los factores que influyen en la mayor o menor acumulación de estas sustancias en la baya (He et al., 2005; Hidalgo, 2006). De entre los diferentes elementos que se encuentran en las uvas, el potasio es el catión más abundante, seguido del calcio y el magnesio. El potasio tiene una vital importancia en la nutrición de la vid, pues está implicado en procesos elementales, como la activación enzimática (Leigh y Wyn Jones, 1984; Walker et al., 1998), el proceso de transporte y translocación de asimilados en las membranas celulares (Patrick et al., 2001), y la regulación de los potenciales osmótico y de membrana (Davies y Zhang, 1991; Leigh, 2001).

La cantidad de estas sustancias presentes en la uva en el momento de vendimia, depende de múltiples factores. Entre ellos, la variedad y el clon (García et al., 2017; Arrizabalaga et al., 2018), las condiciones edafoclimatológicas (Vilanova et al., 2015), las condiciones de cultivo (Intrigliolo y Castel, 2010; Sadras et al., 2013; Medrano et al., 2018; Li et al., 2018) juegan un importante papel.

1.2.2. Los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos representan un grupo importante de pigmentos ampliamente distribuido en todo el reino vegetal. En las bayas de *Vitis vinifera* L., estos compuestos se encuentran mayoritariamente en las partes sólidas de la uva (hollejo y semillas) (Cheynier y Rigaud, 1986). Según su estructura química se clasifican en compuestos no flavonoideos (ácidos fenólicos y estilbenos) y compuestos flavonoideos (antocianos, flavanoles y flavonoles) (Cheynier et al., 2000). Estas sustancias son indicadores de la calidad de las uvas e influyen directamente en la del vino, confiriéndole una parte de su estructura y propiedades sensoriales (Cheynier et al., 1998; Downey et al., 2004).

El tipo y la concentración de los compuestos fenólicos en las uvas y vinos tintos ha sido objeto de diversas revisiones bibliográficas (Monagas et al., 2005; Kennedy, 2008). A día de hoy se sabe que la concentración en la uva de estas sustancias en el momento de la vendimia depende de diversos factores, como pueden ser la variedad de uva (Mazza et al., 1999; Ryan y Revilla, 2003; Fanzone et al., 2012), la práctica vitivinícola (Petrie y Clingeleffer, 2006; Valdés et al., 2009; Lee y Skinkis, 2013; Gamero, 2015), las condiciones climáticas (Spayd et al., 2002; Mori et al., 2007; Tarara et al., 2008) y

también del método de extracción y análisis de los mismos (Guidoni et al., 2002; Canals et al., 2005; Cortell et al., 2007). La cantidad de estas sustancias que se transfieren al vino durante el proceso de vinificación depende del tipo y de las condiciones en que se lleve a cabo el proceso (Sacchi et al., 2005).

La Tabla 1.2 muestra la localización, concentración, el interés enológico y las propiedades sensoriales que aportan a los vinos las diferentes familias que integran este grupo de sustancias.

Tabla 1.2. Localización, concentración, propiedades sensoriales y principal interés enológico de los compuestos fenólicos de las bayas.

Compuesto		Localización	Concentración	Propiedad sensorial	Principal interés enológico
Compuestos fenólicos no flavonoides	Ácidos fenólicos (Ác.hidroxicinámicos)	Pulpa y partes sólidas de la uva	20-150 mg/kg (Ferrandino et al., 2012)	Amargor, astringencia y acidez. (Hufnagel y Hofmann, 2008)	Reacciones de copigmentación (Boulton, 2001)
	Ácidos fenólicos (Ác. hidroxibenzóicos)	Pulpa y partes sólidas de la uva	1-2 mg/L (Su y Singleton, 1969)	Amargor, astringencia y acidez. (Hufnagel y Hofmann, 2008)	Reacciones de copigmentación (Boulton, 2001)
	Estilbenos	Hollejos y semillas	20-43µg/g (Goldberg et al., 1995; Ector et al., 1996)	No interfieren las características sensoriales del vino	Propiedades saludables de los vinos tintos (Fremont, 2000)
Compuestos fenólicos flavonoides	Antocianos	Hollejos	500 y 3000 mg/kg (Ferrandino et al., 2012)	Responsables del color de los vinos tintos (Ribéreau-Gayon, 1964)	Reacciones de copigmentación (Boulton, 2001)
	Flavanoles	Hollejos y semillas	14-3600 mg/kg (Bayonove et al., 2000)	Amargor, astringencia (Gawel, 1998)	Reacciones de copigmentación (Boulton, 2001)
	Flavonoles	Hollejos	10-300 mg/kg (Ferrandino et al., 2012)	Amargor, astringencia y acidez. (Hufnagel y Hofmann, 2008). Contribución a la componente amarilla del color de los vinos (Hermosín-Gutierrez et al., 2011)	Reacciones de copigmentación (Boulton, 2001)

1.2.2.1. Compuestos fenólicos no flavonoideos

- **Ácidos fenólicos**

- *Ácidos hidroxicinámicos*

Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran bajo la forma de ésteres tartáricos de ácidos cinámicos. Los predominantes en las uvas y vinos son los ácidos cutárico (para-cumaril tartárico), caftárico (cafeil tartárico) y fertárico (ferulil tartárico) y sus isómeros (Adams, 2006). Las levaduras del género *Brettanomyces Dekkera*, pueden degradar los ácidos ferúlico y cumárico y transformarlos en fenoles volátiles. Estas sustancias son responsables de defectos olfativos, que disminuyen la calidad sensorial de los vinos (Chatonnet et al., 1995).

- *Ácidos hidroxibenzoicos*

El principal ácido hidroxibenzoico de la uva es el ácido gálico, en forma libre o bien como éster de flavanol ((-)-epicatequina-3-galato) en concentraciones de 1-2 mg/L (Su y Singleton, 1969). En el mosto de uva recién obtenido, estos ácidos se oxidan fácilmente formando quinonas responsables del pardeamiento del mosto.

- **Estilbenos**

En este grupo de compuestos destaca el resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) que es producido por la vid en respuesta a un ataque fúngico y por la exposición a altos niveles de radiación ultravioleta (Jeandet et al., 1991). Este compuesto puede hallarse en formas libres (isómeros *cis* y *trans*) o glucosiladas.

1.2.2.2. Compuestos fenólicos flavonoideos

Los compuestos flavonoideos se clasifican en función de su estructura química en: **antocianos, flavanoles y flavonoles**. Los antocianos se hallan únicamente en las variedades tintas y el resto de los compuestos se encuentran tanto en las variedades tintas como en las blancas.

- **Antocianos**

Los antocianos o antocianinas representan un importante porcentaje de los flavonoides presentes en las bayas de las variedades tintas. Desde un punto de vista general, los antocianos son heterósidos formados por la combinación de una molécula de azúcar y un aglicón (antocianidina) que contiene un núcleo flavilium. En la especie *Vitis vinifera* L. se han hallado las siguientes antocianidinas: cianidina, peonidina, petunidina, delfinidina, pelargonidina y malvidina, que difieren entre sí en el número y posición de los sustituyentes hidroxilos y metoxilos localizados en el anillo bencénico. En lo que respecta al azúcar, que generalmente es la glucosa, puede presentarse esterificado por un ácido fenólico, generalmente el cafeico o el ácido *p*-cumárico (antocianinas *p*-cumariladas), o el acético (antocianinas acetiladas) (Monagas et al., 2005). La gran variabilidad en cuanto a distribución y concentración de compuestos antociánicos existente entre las diferentes variedades permite discriminarlas y caracterizarlas en función de su perfil antociánico (Ortega–Regules et al., 2006).

Los antocianos que se extraen del hollejo de la uva tinta durante la maceración son los compuestos responsables del color rojo de los vinos, siendo responsables también de los tonos azules, púrpuras y morados (Mazza y Brouillard, 1990).

- **Flavanoles**

Los flavanos 3-oles (3-flavanoles) se hallan en la uva en forma de monómeros y bajo formas más o menos polimerizadas, constituyendo los denominados taninos catequicos o taninos condensados. Los flavanoles monoméricos presentes en las bayas son la (+)-catequina y su isómero la (-)-epicatequina, la galocatequina y la epigalocatequina y existen también los derivados en forma de éster de ácido gálico. A partir de estos monómeros se establecen las formas oligoméricas denominadas proantocianidinas (derivados de la catequina y epicatequina) y prodelfinidinas (derivados de la galocatequina y epigalocatequina). Cuando el número de unidades es mayor se forman los taninos. La polimerización de los flavanoles, se produce mediante una condensación oxidativa entre el carbono C4 del heterociclo y el C8 o C6 adyacente. A estos polímeros, cuyos monómeros se encuentran unidos mediante un solo enlace, se les denomina polímeros de tipo B. Las procianidinas dímeras B1 (epicatequina- (4 β \rightarrow 8) –catequina), B2 ((-)-Epicatequina-(4 β \rightarrow 8)-(-)-epicatequina) y B3 (catequina-(4 α \rightarrow 8)-catequina) son

las más comunes en las uvas. La procianidina B1 se localiza en la piel de la uva, la B2 es la más abundante tanto en pieles como en semillas y la B3 se localiza principalmente en las semillas (De Freitas et al, 2000; González-Manzano et al, 2004).

Los flavanoles existentes en los hollejos y las semillas difieren en tamaño y tipo de unidades, lo que les confiere diferentes propiedades sensoriales, los presentes en las semillas son más cortos y tienen un alto porcentaje de unidades esterificadas con ácido gálico, en tanto que los de la piel son generalmente mayores y presentan una proporción significativa de subunidades de epigallocatequina trihidroxilada (Prieur et al., 1994; Souquet et al., 1996).

- **Flavonoles**

Estos compuestos se encuentran en las bayas principalmente bajo la forma de heterósidos (glucósidos, galactósidos, ramnósidos, rutinósidos o glucurónidos) de kaempferol, quercetina, isoramnetina y miricetina (Adams, 2006). Se han hallado también flavonoles en forma de 3-galactosidos y 3-di-glicosidos (Makris et al., 2006) así como 3-glucosido de laricitrina y siringetina (Castillo-Muñoz et al., 2007).

1.2.2.3. Reacciones de copigmentación.

La copigmentación en los vinos es el resultado de las interacciones moleculares entre pigmentos antociánicos y otras moléculas orgánicas, llamadas cofactores o copigmentos (sustancias poco coloreadas o incoloras), que forman asociaciones moleculares o complejos de apilamiento vertical tipo “sándwich”. Los copigmentos o cofactores más comunes son los ácidos fenólicos y los flavonoles (Rustioni et al., 2012). Estas sustancias poseen sistemas capaces de asociarse con el ion flavilium, protegiéndolo del ataque nucleofílico del agua (Bakowska et al., 2003) impidiendo que éstas moléculas alcancen al antociano, lo hidraten y lo decoloren.

La formación del complejo de copigmentación provoca un incremento de la intensidad del color rojo del vino tinto (efecto hiperocrómico) así como un viraje hacia tonalidades más azuladas (efecto batocrómico) (Baranowski y Nagel, 1983; Brouillard et al., 1989; Bloor y Falshaw, 2000). Estas estructuras, que pueden representar del 30-50 % del color en vinos tintos jóvenes, son importantes para la estabilidad del color de éste (Boulton, 2001). Por tanto, la presencia de precursores de copigmentación o cofactores en las uvas

y en el mosto puede ejercer una gran influencia sobre la intensidad del color del vino obtenido y sobre estabilidad del mismo (Darias-Martin et al., 2001; Darias-Martin et al., 2002).

Se ha demostrado que la formación de copigmentos provoca un aumento de la extracción de antocianinas durante la vinificación (Schwarz et al., 2005) y que las técnicas vitícolas que aumentan la exposición a la luz del racimo provocan aumento del contenido de copigmentos en las bayas (Spayd et al., 2002; Downey et al., 2004, Giovanelli y Brenna, 2007), por tanto, el análisis del efecto de cualquier nueva práctica en el viñedo debe incluir el estudio sobre estas estructuras.

1.2.3. Las sustancias nitrogenadas

El nitrógeno es uno de los macronutrientes más abundantes que los vegetales obtienen del suelo. Los compuestos nitrogenados de la uva se clasifican en inorgánicos y orgánicos, y alcanzan una concentración total de entre 100 y 1200 mg/L, dependiendo del cultivar, del estado de maduración, o de las condiciones edafoclimáticas (Bell y Henschke, 2005).

Los compuestos nitrogenados están implicados en muchas de las funciones biológicas y procesos metabólicos de la uva. Posteriormente, durante el proceso de vinificación, las levaduras y bacterias que llevan a cabo la fermentación alcohólica y maloláctica respectivamente, necesitan una determinada cantidad de nitrógeno para el desarrollo de sus funciones vitales (Bely et al., 1990; Bell y Henschke, 2005; Garde Cerdán et al., 2009).

Por otra parte, el perfil aminoacídico de la uva es importante para las características sensoriales del futuro vino, pues algunos de ellos son precursores de sustancias volátiles que determinan en gran medida el aroma de los vinos elaborados (Hernández-Orte et al., 2002).

1.2.3.1. Compuestos nitrogenados inorgánicos

Los compuestos nitrogenados inorgánicos presentes en las bayas son sales de nitrito o nitrato (NO_2^- , NO_3^-) y de iones amonio (NH_4^+). El contenido de estas sustancias depende del grado de maduración y del estado sanitario. En un estudio sobre la composición nitrogenada de mostos extremeños, Macías (1980) observó que los elaborados a partir de

uvas con podredumbre mostraron un bajo contenido de nitrógeno amoniacal. En su estudio, [Trioli y Paronetto \(1992\)](#) indicaron que una buena disponibilidad de contenido de nitrógeno amoniacal durante el proceso de fermentación disminuía la concentración de alcoholes superiores y aumentaba la de los ésteres etílicos, principales sustancias volátiles responsables del aroma de los vinos, dando lugar a vinos más finos y afruitados.

1.2.3.2. Compuestos nitrogenados orgánicos

Los compuestos nitrogenados orgánicos más abundantes en las uvas son los aminoácidos. También se han hallado polipéptidos, proteínas, urea y derivados de ácidos nucleicos. En la uva se han identificado y cuantificado alrededor de 30 aminoácidos ([Hernández-Orte et al., 1999](#); [Valdés et al., 2011](#); [Ortega-Heras et al., 2014](#)). Estos compuestos pueden clasificarse en función de su ruta metabólica (precursor biosintético común) en las familias que se citan en la Tabla 1.3 ([Nelson y Cox, 2005](#); [Gregan et al., 2012](#); [Martínez-Lüscher et al., 2014b](#)).

Tabla 1.3. Clasificación de los aminoácidos en función de su precursor biosintético común.

Familia	Aminoácido
α -Cetoglutarato	Prolina, arginina, ácido glutámico, ácido γ -amino-n-butírico
Piruvato	L-alanina, L-valina y L-leucina
Oxalacetato	L-treonina, ácido L-aspartico, L-asparagina, L-isoleucina, L-metionina, L-lisina
Fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato	L-tirosina, L-fenilalanina y triptófano
3-Fosfoglicerato	L-serina, glicina y cisteína
Ribosa -5-fosfato	L-histidina

[Bell y Henschke \(2005\)](#) realizaron una extensa revisión de los factores que afectan a la concentración de compuestos nitrogenados de mostos y vinos. La concentración de aminoácidos es dependiente de factores como la variedad de vid y el patrón ([Stines et al., 2000](#)), la localización y las características edafoclimáticas ([Huang y Ough, 1989](#)), la campaña ([Bell y Robson, 1999](#)), y las prácticas culturales; el manejo del suelo ([Spring, 2001](#)), los sistemas de conducción ([Miele et al., 2000](#)), el sombreado y la temperatura de la cubierta vegetal ([Ewart y Kliewer, 1977](#); [Smart et al., 1988](#); [Perez-Harvey y Witting, 2001](#)). También juegan un importante papel la forma, dosis y momento de aplicación de fuentes nitrogenadas ([Kliewer, 1971](#); [Bell et al., 1979](#); [Chang y Kliewer, 1991](#); [Goldspink y Gordon, 1991](#); [Peacock et al., 1991](#); [Spayd et al., 1994](#); [Bell y](#)

Robson, 1999; Conradie, 2001) y así como el estado de madurez de la uva (**Kliewer, 1969; Gockowiak y Henschke, 1992; Valdés et al., 2011**). Estudios recientes (**Gardé-Cerdán et al., 2014; Gardé-Cerdán et al., 2015**) han observado que la aplicación foliar de compuestos nitrogenados (fenilalanina y urea) produce un incremento de la concentración de aminoácidos en mostos del cv. Tempranillo.

Respecto a la zona de la uva en la que se encuentran estas sustancias, el perfil de los aminoácidos libres en las bayas maduras varía considerablemente según el tejido analizado (piel, pulpa y semillas). Las diferentes investigaciones proporcionan distintos resultados sobre las contribuciones relativas de estos tejidos al contenido total de aminoácidos: en bayas inmaduras del cv. Noble, **Lamikanra y Kassa (1999)** hallaron que en las semillas se localizaban la mayor parte de los aminoácidos (50 %), seguidas por la pulpa (38 %) y la piel (12 %). Posteriormente, **Stines et al. (2000)** hallaron que la mayoría de los aminoácidos de las bayas estaban presentes en la pulpa (66-77 %), en tanto que la piel contenía únicamente el 15-23 % y las semillas 8,5-11 % en las bayas de los cv. Cabernet Sauvignon y Riesling. Las diferencias parecen depender de los cultivares, ya que exhiben una notable diversidad en la concentración y composición de aminoácidos libres en las bayas (**Garde-Cerdán et al., 2009**).

En la mayoría de las variedades de *Vitis vinifera* L., la arginina y la prolina son los aminoácidos que predominan durante todos los estados de maduración (**Kliewer, 1968; Bolin y Pretrucci, 1985; Valero et al., 2003; Garde-Cerdán et al., 2007**). En un trabajo desarrollado en el suroeste de España se observó, que en las variedades Shiraz, Merlot y Petit Verdot, el aminoácido mayoritario fue la arginina, representando un 20-50 % del total de los aminoácidos presentes en las bayas en el momento de vendimia (**Garde-Cerdán et al., 2009**). El estudio realizado en diferentes localizaciones de España, sobre el perfil amínico de 4 variedades blancas (Airén, Cigüente, Moscatel de Alejandría y Verdejo) realizado por **Valdés et al. (2015)** mostró diferencias entre las distintas variedades tanto en función de su perfil amínico como de la concentración de aminoácidos individuales de las uvas. La variedad Moscatel resultó ser una variedad rica en aminoácidos prolina y arginina. En Verdejo se encontraron las mayores cantidades de los aminoácidos precursores de aromas fermentativos (aspártico, fenilalanina y treonina) y Cigüente fue la variedad de mayor contenido en aminoácidos azufrados (cisteína y metionina).

Como se ha comentado anteriormente, la composición volátil de los vinos está fuertemente influenciada por la concentración de aminoácidos de los mostos (Hernández-Orte et al., 2002). Diversos autores han demostrado que los mostos con una alta concentración de aminoácidos dan lugar a vinos con elevadas concentraciones de ésteres, en particular ésteres etílicos, compuestos que contribuyen a los aromas frutales de los vinos (Ough y Bell, 1980; Ough y Lee, 1981; Hernández-Orte et al., 2005). Los aminoácidos fenilalanina, leucina, isoleucina, valina, tirosina y metionina, son considerados precursores de compuestos volátiles de origen fermentativo (2-feniletanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1 butanol, isobutanol, tirosol y metionol, respectivamente). Aunque actualmente existe cierta discrepancia respecto a dicha relación, especialmente en una matriz tan compleja como es el vinos. Vilanova et al. (2007) mostraron que existe una relación entre la demanda de nitrógeno por parte de la levadura y la formación de compuestos volátiles. Las cepas con una alta demanda de nitrógeno tienden a producir vinos con mayores concentraciones de ésteres y menores concentraciones de alcoholes superiores, fenoles volátiles, alcoholes monoterpénicos y otros alcoholes menos volátiles. En su reciente trabajo, Fairbairn et al. (2017) han ratificado la relación entre la concentración de determinados aminoácidos libres y la formación de compuestos volátiles en mostos sintéticos, obteniendo los siguientes resultados: el contenido de aminoácido valina se asoció con los compuestos volátiles isobutanol y ácido isobutírico, los aminoácidos leucina e isoleucina se relacionaron con el alcohol isoamílico, producción de ácido isovalérico y de acetato de isoamilo. El metabolismo de la fenilalanina condujo a la producción de 2-feniletanol y de acetato de 2-feniletilo. El catabolismo de treonina dio lugar a niveles más altos de propanol, butanol y ácido propiónico, así como niveles moderados de alcohol isoamílico, ácido isovalérico, ácido acético y acetato de etilo. Procopio et al. (2013) han mostrado una relación directa entre la concentración de prolina presente en los mostos y la síntesis de compuestos volátiles. También se ha mostrado la relación entre las cantidades de cisteína y metionina (aminoácidos azufrados) con la presencia de compuestos como el sulfuro de hidrógeno (H₂S), metilmercaptano (metanotiol), etanotiol, metionol y dimetilsulfuro en vinos, compuestos asociados a malos olores que implican la reducción de la calidad sensorial si son superados los umbrales de percepción para dichos compuestos (Anness y Bamforth 1982; De Mora et al., 1986).

Por lo tanto, es necesaria una apropiada composición nitrogenada del mosto para un correcto desarrollo de la fermentación alcohólica, así como para la formación de compuestos positivos relacionados con las percepciones sensoriales de los vinos ([Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2008](#); [Vilanova et al., 2012c](#)).

1.2.3.3. Índices nitrogenados

Como se ha mencionado anteriormente, el amonio y los aminoácidos, son las principales fuentes de nitrógeno para el desarrollo de levaduras y bacterias durante la fermentación alcohólica y maloláctica. A excepción de la prolina y la hidroxiprolina, todos los aminoácidos son asimilables por las levaduras ([Kliewer, 1968](#)). Al conjunto del nitrógeno procedente del ion amonio y de los aminoácidos asimilables se le denomina nitrógeno fácilmente asimilable (*Yeast Assimilable Nitrogen*, YAN). La cantidad de YAN inicial puede afectar a la tasa de fermentación y por tanto a la composición del futuro vino ([Valdés et al., 2011](#)). Generalmente se considera 140 mgN/L como el umbral de YAN para la fermentación completa de mostos con niveles normales de azúcar ([Bely et al., 1990](#); [Bell y Henschke, 2005](#); [Vilanova et al., 2012a](#)), valores inferiores pueden provocar paradas o fermentaciones excesivamente lentas. Cuando la concentración de YAN es insuficiente, se produce la rotura de las proteínas presentes en el mosto, hecho que puede originar un aumento de la concentración de compuestos azufrados que aportan olores desagradables en los vinos ([Vos y Gray, 1979](#); [Ingledew y Kunkee, 1985](#)). El contenido de YAN puede tener un impacto significativo en la producción de muchas sustancias relacionadas con las percepciones sensoriales ([Henschke y Jiranek, 1993](#); [Rapp y Versini, 1996](#); [Tominaga et al., 1998](#); [Pripis-Nicolau et al., 2000](#); [Hernandez Orte et al., 2002](#); [Hernández-Orte et al., 2005](#)). Por otra parte, si el valor de YAN es elevado puede dar lugar al aumento de la concentración de urea y consecuentemente, del carbamato de etilo, compuesto considerado perjudicial para la salud cuando se encuentra en elevadas concentraciones ([Huang y Ough, 1989](#); [Ough et al., 1991](#); [Bell y Henschke, 2005](#)).

1.2.4. Los compuestos aromáticos

El aroma del vino está consituido por una gran cantidad de compuestos volátiles que pueden ser clasificados en función de su origen en aromas varietales, aromas pre-fermentativos, fermentativos y post-fermentativos (Bayonove et al., 2000).

1.2.4.1. Aroma varietal o primario

Los aromas varietales proceden de la uva con la que fue elaborado el vino (Cordonnier, 1977; Mallouchos et al., 2003). Estos compuestos se encuentran en la uva en forma de compuestos volátiles libres y glicosilados (Williams et al., 1989; Winterhalter y Skouroumounis, 1997).

- **Aromas varietales libres**

Dentro de los aromas varietales libres, los compuestos terpénicos, y entre ellos los **monoterpenos**, entre los que destacan el linalol, geraniol, nerol y citronelol son los mayoritarios. Estos compuestos presentan un bajo umbral de percepción y pueden contribuir con notas florales y frutales al aroma del vino. Se acumulan principalmente en el hollejo, por lo tanto, la tecnología utilizada para extraer el mosto tiene influencia sobre las características aromáticas del vino elaborado (Bayonove et al., 2000). Otros compuestos integrantes del aroma varietal libre son los dioles terpénicos y pirazinas. Estas últimas son muy abundantes en la variedad Cabernet Sauvignon (Lacey et al., 1991).

Los **C13-norisoprenoides** más frecuentes son la α -damascenona y la α -ionona. Estos compuestos, que proceden de la degradación oxidativa de carotenoides, poseen un umbral de percepción olfativo relativamente bajo, y su presencia en los vinos se asocia con notas florales y frutales (Enzell, 1985; Baumes et al., 1986; Sefton et al., 1993).

- **Aromas varietales ligados o precursores aromáticos**

Los aromas varietales glicosilados o precursores del aroma son moléculas no volátiles, susceptibles de liberar aromas bajo la influencia de diferentes factores (Baumes et al., 2009) con lo que constituyen una reserva potencial de aromas. Aparecen de forma mayoritaria como glicósidos y son liberados durante la fermentación y a lo largo del

envejecimiento mediante acción enzimática o por hidrólisis ácida (Di Stefano et al., 1995).

1.2.4.2. Aroma de origen pre-fermentativo

Los **aldehídos** con 6 átomos de carbono (hexanal, (Z)-3-hexenal, (E)-2-hexenal) y sus **alcoholes** correspondientes son los principales responsables de aromas herbáceos y vegetales constituyentes del aroma prefermentativo de los vinos (Joslin y Ough, 1978; Ramey et al., 1986; Crouzet et al., 1998; Moio et al., 2004). Estos compuestos se forman durante el período de tiempo transcurrido desde la cosecha hasta el comienzo de la fermentación alcohólica del mosto. Los efectos mecánicos del estrujado, prensado y otros tratamientos prefermentativos implican fenómenos de ruptura a nivel celular. Estas roturas permiten a determinados sistemas enzimáticos (acil hidrolasa y lipoxigenasa entre otras) entrar en contacto con los ácidos linoleico y linolénico que Drawert et al. (1986) identificaron como precursores de los compuestos C6. La concentración de estos compuestos aumenta con la oxigenación del mosto y con la intensidad del tratamiento mecánico a que se somete la uva (Cordonier y Bayonove, 1981).

1.2.4.3. Aroma de origen fermentativo

El aroma de origen fermentativo está constituido por los compuestos volátiles que se forman durante la fermentación alcohólica del mosto. Cuantitativamente, se trata del grupo de compuestos más numeroso, aunque se ha indicado que el impacto en el aroma global de los vinos no es tan acusado (Ferreira y Cacho, 2009). Los principales constituyentes volátiles de la etapa fermentativa pueden ser clasificados según su constitución química en **alcoholes**, **ácidos** y sus **ésteres**, **compuestos carbonilados**, **compuestos azufrados**, **lactonas** y **fenóles volátiles** (Bayonove et al., 1998).

- **Alcoholes superiores**

Los principales **alcoholes** constituyentes del aroma de fermentación, denominados normalmente alcoholes superiores, son los 2 y 3-metil-1-butanol (alcoholes isoamílicos), el propanol, el 2-metil-1-propanol, butanol, pentanol, 2-feniletanol, 3-metiltio-propanol (metionol), tirosol y triptofol. Los contenidos medios, que suelen ser del orden de 150-500 mg/L, se consideran óptimos para el aroma de los vinos, aunque determinados autores han indicado que concentraciones superiores a 300 mg/L pueden ser perjudiciales para la

calidad aromática ([Rapp y Mandery, 1986](#); [Rapp y Versini, 1995](#)). Su formación está ligada tanto al catabolismo de aminoácidos como al metabolismo de azúcares. La contribución de cada una de estas rutas de síntesis dependerá de la cantidad de azúcares y de la de aminoácidos asimilables por las levaduras presentes en el medio ([Henschke y Jinarek, 1993](#)).

- **Ácidos grasos y sus ésteres**

Los **ácidos grasos y sus ésteres** son, junto con los alcoholes, los principales responsables del aroma fermentativo. Generalmente, esta familia se compone de ácidos grasos de cadena corta (C2 a C10), de sus éteres etílicos y de los acetatos de alcoholes superiores. Estos compuestos derivan todos del acil-S-coenzima A, que da lugar a los ácidos grasos por hidrólisis, o a los ésteres etílicos de ácidos grasos ([Bayonove et al., 2000](#)). Las condiciones de fermentación ejercen una gran influencia sobre la síntesis de estos ácidos y ésteres: una baja temperatura, condiciones de anaerobiosis estrictas y una mayor concentración de nitrógeno son los factores más favorables para su formación. ([Shinohara, 1984](#)). Los ácidos grasos de hasta 6 átomos de carbono participan en la acidez volátil del vino, pudiendo ocasionar mermas de la calidad cuando se encuentran en concentraciones comprendidas entre 0,7-1,0 g/L. El ácido acético representa así más del 95 % de la acidez volátil producida por la levadura, aunque se trata de un compuesto necesario en el aroma del vino, con unos contenidos óptimos comprendidos entre 200 y 700 mg/L ([Dubois, 1994](#)). Los ácidos grasos más característicos son los ácidos hexanóico, octanóico y decanóico, que aportan notas de aromas lácticos en concentraciones entre 4 y 10 mg/L, aunque en concentraciones muy elevadas (>20 mg/L) pueden aportar olores desagradables ([Shinohara, 1985](#)). Además, se ha demostrado que, a medida que aumenta la longitud de su cadena, la volatilidad disminuye, apareciendo olores rancios ([Francis y Newton, 2005](#)).

Los **ésteres etílicos** se forman por la reacción entre el etanol y los ácidos grasos, mientras que los acetatos son los resultantes de la esterificación de un alcohol superior con el ácido acético. Los ésteres, a excepción del acetato de etilo, presentan aromas fundamentalmente frutales. La síntesis de ésteres depende de la necesidad de las levaduras de formar ácidos grasos, que, a su vez, depende de la concentración de nitrógeno fácilmente asimilable presente en el mosto ([Bell et al., 1979](#); [Nykänen, 1986](#)). Los principales contribuyentes al aroma de los vinos jóvenes son el butirato de etilo,

hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) y el acetato de 2-feniletilo (Dubois, 1994; Oliveira et al., 2008).

- **Compuestos carbonilados**

Los **compuestos carbonilados** son formados por las levaduras mediante descarboxilación de los ácidos α -cetónicos y se encuentran en los vinos en cantidades muy pequeñas. El más abundante es el acetaldehído, cuya concentración aumenta en los vinos oxidados. Otros compuestos de esta familia que pueden influir en el aroma del vino son la acetoína, diacetilo, acetol, 3-hidroxipentano-2-ona, pentano-2,3-diona y piruvaldehído (Guillou y Bertrand, 1995).

1.2.4.4. Aroma de origen post-fermentativo

Se forma durante la conservación, crianza y envejecimiento del vino mediante reacciones químicas de oxidación y reducción (Benítez et al., 2003; Tominaga et al., 2003). Estas modificaciones afectan a los compuestos volátiles y van a depender de la composición del vino, de su pH, del tiempo de almacenamiento y de la temperatura del vino (Marais y Pool, 1980; Usseglio-Tomasset, 1983). Durante la conservación del vino los ésteres sufren reacciones químicas de hidrólisis y esterificación. Entre los ésteres, los acetatos (ésteres de ácido acético y alcoholes superiores) son los más sensibles al pH. La pérdida de acetatos a pH bajos implica una pérdida de frescor y afrutado en vinos jóvenes. Por otra parte, durante este periodo los alcoholes superiores evolucionan poco (Simpson, 1978; Marais y Pool, 1980; Marais et al., 1992). El contenido en 2-feniletanol, uno de los alcoholes superiores que presentan impacto olfativo, disminuye ligeramente, siendo esta disminución mayor cuando aumenta la temperatura. El vino puede enriquecerse en monoterpenos y norisoprenoides, como consecuencia de la hidrólisis ácida de las formas glicosiladas en la uva. Sin embargo, la conservación en botella provoca una disminución de fenoles volátiles (4-vinilfenol y 4-vinilguayacol) disminuyendo el aroma fenolado de ciertos vinos.

1.2.5. Evolución de la composición de la uva durante el proceso de maduración

La maduración de la uva es el periodo de 40-50 días que transcurre desde el envero de la uva a la madurez (Kennedy, 2002). Durante este periodo, los cambios de concentración

de los diferentes componentes son relativamente rápidos, por lo que una diferencia de pocos días en la fecha de vendimia puede originar diferencias significativas en la composición físico-química de las uvas cosechadas ([González-Neves et al., 2011](#)). Por tanto, la elección del momento de cosecha es un factor crítico para la calidad de los vinos.

La velocidad de acumulación y degradación de los diferentes metabolitos existentes en la uva durante el proceso de maduración y por tanto la cantidad y distribución final en el momento de vendimia depende de factores genéticos, edafoclimáticos y, en gran medida, de las técnicas de cultivo empleadas ([Deluc et al., 2006](#); [Santesteban y Royo, 2006](#); [Martínez de Toda y Balda, 2013](#); [Lasanta et al., 2014](#); [Filippetti et al., 2015](#)). Todos estos factores hacen que el proceso de maduración no sea totalmente homogéneo, existiendo una gran variabilidad dentro del viñedo y del propio racimo ([Dai et al., 2011](#); [Uriarte, 2016](#)).

1.2.5.1. Evolución de azúcares y ácidos

El término *maduración tecnológica* se refiere a la evolución de los componentes mayoritarios de la pulpa (azúcares y ácidos) durante el periodo comprendido entre el envero y la vendimia.

La acumulación de los azúcares comienza en el envero como consecuencia de una movilización de las reservas acumuladas en la madera de la planta de vid, y posteriormente continúa por los aportes diarios producidos por la fotosíntesis de las hojas, hasta alcanzar los valores máximos en momentos cercanos a la vendimia ([Ribéreau-Gayon, 1964](#)).

El ácido tartárico se acumula en la pulpa en fechas próximas al envero. Los descensos de concentración observados durante la maduración se deben, por una parte, a la dilución originada por el incremento de volumen de las uvas que ocurre durante este periodo y por otra, a la salificación o neutralización por parte de los cationes ([Possner y Kliever, 1985](#); [Robinson y Davies, 2000](#)). La concentración de ácido málico, que alcanza los máximos niveles en la uva en el envero, se reduce drásticamente durante este periodo, ya que es utilizado como sustrato en la respiración celular y para la biosíntesis de glucosa.

Por tanto, la madurez tecnológica de la baya se evalúa en función de su contenido en azúcares y ácidos. Por lo general, se considera que la baya ha alcanzado la madurez

tecnológica (o está tecnológicamente madura) cuando adquiere el valor deseado por el viticultor en función del vino que desee elaborar. En ocasiones también se contemplan relaciones entre el contenido de azúcares y ácidos para determinar el grado de madurez tecnológica de la uva.

1.2.5.2. Evolución de compuestos fenólicos

La síntesis y acumulación de los compuestos fenólicos se produce durante la maduración de la uva y depende de factores genéticos (Cravero y Di Stefano, 1990; Di Stefano et al., 2002; Nuñez et al., 2004), edafoclimáticos (Yokutsuka et al., 1999; Diaz Plaza et al., 2000; Vilanova et al., 2015) y culturales (Soto et al., 2010; Kontoudakis et al., 2011; Gamero, 2015).

La evolución de la acumulación de dichos compuestos durante el período de maduración es diferente en función de la clase de compuestos considerada. Entre los compuestos no flavonoides, los ácidos hidroxicinámicos se acumulan en la pulpa a partir del envero, y posteriormente a medida que avanza el período de maduración su concentración disminuye hasta estabilizarse en las uvas maduras (Romeyer et al., 1983).

En lo que respecta a los compuestos flavonoides, los estudios indican que la síntesis de antocianos se inicia en los antocianoplastos situados en el citoplasma y una vez formados, migran hacia la vacuola donde se acumulan volviéndola más pigmentada y coloreando el hollejo (Pecket et al., 1980). Este proceso, que comienza en el envero, marca el inicio del período de maduración. Durante éste, los antocianos continúan acumulándose en las bayas hasta llegar a un máximo que puede producirse en fechas coincidentes, o más o menos próximas a la vendimia, y tras dicho máximo son parcialmente degradados (Ojeda et al., 2002; Downey et al., 2004; Adams, 2006).

En cuanto a los flavanoles, existe cierta controversia sobre su evolución. Según Downey et al. (2003) tras el envero, momento en que se alcanza el valor máximo, la concentración disminuye hasta el momento de vendimia. Sin embargo, otros estudios indican fluctuaciones o incluso incrementos durante dicho periodo (Saint-Cricq et al., 1997; Harbertson et al., 2002; Delgado et al., 2004; Canals et al., 2005; Bordiga et al., 2011). A este respecto, es preciso recordar la desigual distribución de estos compuestos en la baya. En las semillas, la concentración de monómeros (catequina y

epicatequina) y la de los dímeros (procianidinas) es máxima en el envero. Le sigue una etapa de marcado descenso hasta fechas cercanas a la madurez y tras ese momento, permanece relativamente constante (Kupina et al., 2003; Versari et al., 2004). El descenso de concentración de los monómeros y dímeros de flavanol, se explica en base a los fenómenos de oxidación (Nieuwoudt et al., 2004; Moreira et al., 2005) y de síntesis de pigmentos polímeros que hace aumentar el grado medio de polimerización en las semillas durante la maduración (Lleti, et al., 2005; Dixit et al., 2005; Moreira et al., 2005). Así pues, en general, a partir del envero los contenidos de flavanoles monómeros y dímeros en las pepitas sufren un progresivo descenso ya que se produce un incremento de su grado de polimerización, y una disminución de su extractabilidad debido a la lignificación de las semillas (Sharma et al., 2009). Teniendo en cuenta lo anterior, se puede afirmar que las semillas de las uvas inmaduras suelen liberar mayores cantidades de proantocianidinas (Peyrot Des Gachons y Kennedy, 2003), lo que lleva a obtener vinos muy amargos y astringentes.

En los hollejos, las procianidinas presentan una evolución similar a las de las semillas, su concentración es máxima en los primeros días de la maduración y posteriormente sucede un descenso progresivo (Kupina et al., 2003) debido a reacciones de polimerización. Consecuentemente, la presencia de flavanoles de mayor grado de polimerización, taninos condensados, en los hollejos aumenta durante la maduración, aunque su acumulación es más lenta y su máximo se puede alcanzar algunos días después que el de los antocianos.

Por lo tanto, en las uvas maduras, la concentración y extractabilidad de los flavanoles del hollejo es más elevada que en las semillas (Pérez-Margariño y González-San José, 2004).

Finalmente, la síntesis y acumulación de flavonoles es similar a la de los antocianos, se produce un incremento rápido a partir del envero y posteriormente su acumulación se ralentiza hasta alcanzar los valores máximos y decrecer ligeramente durante las últimas etapas de la madurez (Kennedy et al., 2002).

Por otra parte, un aspecto muy importante a considerar durante el proceso de maduración es que las paredes celulares se van debilitando a lo largo del periodo de maduración, facilitando la extracción de los compuestos fenólicos (Venencie et al., 1997;

Venencie et al., 1998).

Es importante que, en el momento de cosecha, la uva tenga una buena y equilibrada dotación polifenólica, principalmente cuando se trata de variedades tintas. Por ello, a finales de los años 90 se comenzó a utilizar la composición fenólica de la uva como criterio de decisión de la fecha de vendimia en la vinificación de variedades tintas, surgiendo así el concepto de madurez fenólica (Glories, 1999a; Saint Cricq et al., 1999). La madurez fenólica abarca no solamente la concentración de compuestos fenólicos, principalmente antocianos y taninos, sino también la facilidad con que serán extraídos en el proceso de vinificación (Glories, 1999a). Una baya fenólicamente madura posee niveles adecuados de antocianos y taninos condensados que son fácilmente extraíbles de sus hollejos. En la actualidad existen muchas metodologías analíticas para evaluar el estado de madurez fenólica de las uvas (Vidal-Aragón et al., 2009; Fragoso et al., 2010).

En este trabajo, se ha considerado que las uvas están fenólicamente maduras en el momento en que se alcanza el valor máximo del contenido en antocianos.

1.2.5.3. Evolución de compuestos aromáticos varietales

La síntesis de compuestos volátiles varietales está muy influenciada por la variedad, el terroir y las prácticas agronómicas (Baumes et al., 1986; Reynolds et al., 1994; Gómez et al., 1995; Ferreira et al., 1996; Ferreira et al., 2000; Vilanova et al., 2007; Vilanova et al., 2012c; Vilanova et al., 2015; Vilanova et al., 2018; Vilanova et al., 2019). La distribución y acumulación de dichos compuestos en el hollejo y pulpa de la baya van a depender de la familia química y de la forma en la que se encuentren (libre o ligada).

En la uva, la concentración de monoterpenos aumenta durante el período de maduración. Las formas libres y ligadas alcanzan los niveles más elevados cuando la uva está madura, permaneciendo constantes hasta fechas posteriores (Coelho et al., 2006). Boidron et al. (1988) describen unas curvas de evolución de los terpenos características, divididas en cinco fases, una primera acumulación rápida, seguida de una ralentización e incluso parada de síntesis, después otra donde se alcanza el máximo aromático, a la que le siguen dos etapas de disminución de la concentración, una rápida al final de la maduración, y una lenta, típica de la sobremaduración.

Hay estudios que demuestran que el máximo de compuestos volátiles varietales en la uva no coincide con su máximo contenido en azúcares (Versini et al., 1981). En este sentido, Vilanova et al. (2012b) no observaron una correlación entre la evolución de los compuestos volátiles y la acumulación de sólidos solubles totales en las variedades Agudelo, Blanco Lexítimo, Godello y Serradelo. Durante la maduración, los monoterpenos de la baya se acumulan tanto en sus formas libres como de precursores, encontrándose, normalmente, estos últimos en cantidades superiores a sus homólogos libres y a su vez en concentraciones más elevadas en el hollejo que en la pulpa (Günata et al, 1985).

Los carotenoides (precursores de los C₁₃-norisoprenoides) se acumulan durante la primera etapa de desarrollo de la baya. A partir del envero comienzan a degradarse para dar lugar a sus formas libres (los norisoprenoides). Para que se produzca este hecho, es indispensable la intervención de la radiación lumínica (Bayonove, 2003).

En general, se asume que el máximo contenido varietal libre se alcanza antes de la madurez tecnológica, al contrario que los precursores del aroma que continúan acumulándose hasta bien avanzada la maduración. Así, según estudios realizados en variedades blancas (Bayonove, 2003), en el caso de las uvas destinadas a la elaboración de vinos jóvenes, resulta preferible realizar la vendimia antes de alcanzar la madurez tecnológica, y más tarde, en el caso de los vinos destinados a crianza.

1.2.5.4. Evolución de compuestos nitrogenados

A lo largo del proceso de maduración, la concentración de nitrógeno inorgánico disminuye ligeramente, transformándose en aminoácidos que a su vez forman oligopéptidos y proteínas (Garde-Cerdán et al., 2009). La mayoría de los trabajos publicados indican que el contenido total de aminoácidos en las uvas o mostos aumenta desde el envero hasta la vendimia (Hernández-Orte et al., 1999; Hilbert et al., 2003). Esta acumulación de aminoácidos libres puede explicarse por una desaceleración del crecimiento de las bayas y una reducción en la síntesis de proteínas (Blouin, 2004; Peña-Gallego et al., 2010). Dichos estudios también observaron que la evolución de los aminoácidos durante la maduración de las uvas no era similar en todas las cosechas estudiadas. Asensio et al. (2001) estudiaron la evolución de la concentración de aminoácidos de mostos procedentes de diferentes clones pertenecientes a 10 variedades

de *Vitis vinifera* L. durante el ciclo de maduración de la uva. Por lo general, a medida que aumentaba la concentración de sólidos solubles se observó un incremento generalizado del contenido de los diferentes aminoácidos, aunque en ciertos casos se observó la tendencia contraria. Dicho estudio estableció ciertas diferencias clonales, por lo que el estudio de la evolución de la composición amínica durante la maduración también permitió establecer una clasificación de las diferentes variedades.

1.3. El clima y la calidad de la uva y el vino

A pesar de que la vid presenta un amplio rango de adaptación a distintas condiciones ambientales, este factor ejerce una fuerte influencia sobre la velocidad de síntesis y acumulación de prácticamente todas las sustancias durante todas las fases de su desarrollo (Winkler, 1965). Por tanto, puede decirse que el clima donde se ubica el viñedo es un factor determinante tanto para la productividad como para las características físico-químicas de la uva y por tanto su calidad. Dal Santo et al. (2013) han indicado que aproximadamente el 18 % de los genes en la vid puede verse afectado por las condiciones ambientales, especialmente las registradas durante el envero. En su estudio comprobaron que los genes relacionados con los fenilpropanoides, implicados en la formación de compuestos aromáticos y polifenoles, se veían fuertemente afectados por las condiciones climáticas estacionales específicas. La temperatura del aire, las precipitaciones y la radiación son los elementos más importantes del clima que ejercen efecto sobre los componentes de la uva.

1.3.1. Temperatura

El rango de temperaturas del aire registrado en el viñedo durante el periodo vegetativo-productivo de la vid, influye directamente sobre la duración del ciclo de maduración de las uvas y los niveles de azúcar, ácidos, precursores aromáticos y sustancias polifenólicas que presenten en el momento de vendimia (Jones et al., 2005). Es importante considerar que la temperatura de las hojas y de las uvas puede llegar a ser de 1 a 8 °C más alta que la temperatura del aire a la que están expuestas, dependiendo de la hora del día y de la orientación a los rayos solares (Kliewer, 1970). Además, junto con la temperatura del aire, la diferencia de temperaturas entre el día y la noche, también es un factor determinante en la acumulación de los diferentes componentes de la uva (Singleton y

Esau, 1968; Kliewer y Torres, 1972; Jackson y Lombard, 1993; Fregoni y Pezzutto, 2000; Tonietto y Carbonneau, 2004).

Las noches frescas, combinadas con temperaturas cálidas durante el día provocan una reducción del pH y una mayor proporción de ácido málico sobre los ácidos totales en comparación con la de los días cálidos y las noches cálidas (**Kliewer, 1973**). Los estudios sobre la importancia de la temperatura en el color de las uvas tintas destacan la importancia de esta diferencia de temperaturas día-noche en la acumulación y síntesis de los compuestos fenólicos (**Kliewer, 1977; Jackson y Lombard, 1993; Fregoni, 1999; Mori et al., 2007; Cohen et al., 2010**). La síntesis de antocianos depende de la temperatura. Se ha demostrado que las elevadas temperaturas pueden inhibir su síntesis y acumulación (**Downey et al., 2006; Tarara et al., 2008**). La síntesis de flavanoles presenta una relación directa con la temperatura, aumentado en los climas más cálidos (**Pastor Del Rio y Kennedy, 2006; Mira de Orduña, 2010**).

En lo que se refiere a los aromas, **Duchêne y Schneider (2005)** comprobaron que la concentración presente en los vinos blancos se vio favorecida en los elaborados a partir de viñedos situados en zonas de climas fríos, pues las temperaturas más bajas incrementaban la síntesis de isoprenoides y pirazinas.

En el actual escenario del cambio climático las temperaturas durante la maduración son excesivas, lo que provoca que las uvas acumulen azúcares con gran velocidad y se incremente rápidamente el valor del pH, obteniéndose uvas con una concentración de azúcares muy elevada (**Jones et al., 2005**). Dichas circunstancias provocan una reducción del período comprendido entre el envero y la madurez tecnológica, cosechándose uvas fenólicamente inmaduras, de las que se obtienen vinos desequilibrados. Por tanto, el empleo de técnicas vitícolas que consigan sincronizar la madurez tecnológica con la madurez fenólica es uno de los retos de la viticultura actual.

1.3.2. Precipitaciones

La planta de la vid presenta una tolerancia a la sequía relativamente alta (**McKersie y Leshem, 1994; Grimplet et al., 2007**). Una vez establecidas en un suelo profundo, con características adecuadas de retención de agua, las vides producen sistemas radicales de varios metros de profundidad que les permiten sobrevivir a graves déficits de agua.

Estudios realizados por diferentes autores, realizados, tanto en zonas de climatología fría (Alemania, Suiza, Francia, Inglaterra y Washington (EEUU)), como de climatología cálida (Australia, Sudáfrica y California (EEUU)) y en distintas variedades, han determinado que las precipitaciones abundantes retrasan el proceso de maduración (Hofäcker et al., 1976; Alleweldt et al., 1984; Jackson y Cherry, 1988). Los trabajos efectuados en el norte de Europa han determinado una correlación negativa entre los ratios de crecimiento y desarrollo de las uvas y las precipitaciones durante las diferentes etapas del desarrollo de las bayas (etapa I o fase inicial de crecimiento rápido, etapa II o fase de latencia y etapa III o fase final de crecimiento) (Hofäcker et al., 1976; Alleweldt et al., 1984). Como consecuencia de todo lo anterior, la mayoría de los vinos de calidad se producen en zonas con precipitaciones anuales inferiores a 700 o 800 mm (Jackson y Schuster, 1987).

Se ha demostrado que el volumen anual de precipitaciones afecta a la dotación polifenólica de la uva, resultando menor en años muy lluviosos. Durante muchos años se pensó que este hecho era probablemente debido a que, en esos años, por lo general, la baya alcanza un mayor tamaño y en consecuencia el valor de la relación hollejo/pulpa es menor (Fregoni, 1977; Freeman et al., 1979; Guilloux, 1981). Sin embargo, los últimos estudios llevados a cabo por el grupo de Castellarin et al. (2007) indican que el estado hídrico de la cepa influye en la expresión génica que regula la síntesis polifenólica.

También la composición aromática de las uvas se ve afectada por la disponibilidad de agua. En general un déficit hídrico en la vid altera la concentración en carotenoides y norisoprenoides (Oliveira et al., 2003). Se ha observado que, el déficit hídrico incrementa los niveles de carotenoides y compuestos C₁₃-norisoprenoides en las uvas, aunque el efecto depende del norisoprenoide medido (Bindon et al., 2007; Grimplet et al., 2007; Ou et al., 2010). En un estudio realizado en California y Nevada (EEUU) con los cv. Cabernet Sauvignon y Chardonnay, Deluc et al. (2009) observaron que un déficit hídrico tenía un impacto significativo sobre el metabolismo de fenilpropanoides, isoprenoides, carotenoides y ácidos grasos en las bayas, aumentando la concentración de compuestos volátiles de las mismas.

Por otra parte, se ha comprobado que la incidencia del estrés hídrico de las cepas sobre la composición de las bayas depende en gran medida del estado fenológico en que se produzca, de la severidad y de la duración de dicho estrés (Romero et al., 2010; Basile

et al., 2012; Gamero, 2015; Intrigliolo et al., 2015; Talaverano, 2017; Valdes et al., 2019). Los estudios han mostrado la importancia del momento en el que se produce el estrés hídrico y su incidencia sobre la composición fenólica, aminoacídica y aromática de las uvas en el momento de vendimia (Valdés et al., 2012; Talaverano, 2017; Vilanova et al., 2018; Vilanova et al., 2019). Se ha observado que el momento más crítico es durante o justo después de la floración. Las precipitaciones de invierno no ejercen una influencia directa sobre las cepas, ya que el agua retenida por el suelo constituye una reserva que se utilizará para alimentar sus raíces, por lo que se produce un efecto a largo plazo sobre la fisiología de la vid, mientras que las lluvias de verano, siempre que no sean excesivas, permiten un buen desarrollo del aparato vegetativo y tienen un efecto favorable sobre el tamaño de las uvas (Winkler, 1978).

1.3.3. Radiación

El mínimo anual de horas de insolación necesarios para el cultivo de la vid se encuentra entre las 1500-1600 horas, de las cuales, aproximadamente 1200 deben recibirse durante el periodo vegetativo (Winkler, 1978).

La luz también incide sobre el desarrollo y la composición final de la uva. Se ha observado que las uvas del cv. Cabernet Sauvignon más expuestas al sol acortaron su ciclo de maduración y mostraron contenidos superiores de los ácidos tartárico, málico y de azúcares que los procedentes de las bayas sombreadas (Crippen y Morrison, 1986; Dokoozlian y Kliewer, 1996). Además, este factor también afecta a la concentración de determinados aminoácidos, compuestos volátiles y sustancias fenólicas de las uvas (Price et al., 1995; Reynolds y Wardle, 1989a; Bureau et al., 2000; Spayd et al., 2002; Downey et al., 2004; Giovanelli y Brenna 2007).

Históricamente la radiación UV-B se ha considerado como un factor de estrés medioambiental con efectos negativos sobre las plantas (Kakani et al., 2003). Sin embargo, se han observado efectos positivos en la síntesis de metabolitos primarios y secundarios de las uvas además de reducir el crecimiento vegetativo, así como la incidencia de patógenos en las cepas (Jug y Rusjan, 2012). En un estudio desarrollado en Nueva Zelanda en el cv. Sauvignon Blanc, en el que se combinó la técnica del deshojado precoz con el empleo de películas plásticas con diferentes filtros UV, Gregan et al. (2012) observaron que los compuestos fenólicos totales aumentaban

sustancialmente en respuesta a la exposición a los rayos UV-B, y comprobaron que esta radiación modificaba el perfil cuantitativo y cualitativo de los flavonoles de los hollejos. La abundancia relativa de flavonoles monosustituidos aumentó proporcionalmente a las dosis UV-B acumuladas y las formas trisustituidas, que eran las predominantes en las bayas no expuestas, fueron menos abundantes a medida que aumentaba la exposición a los rayos UV-B. En lo que respecta a los antocianos, en un ensayo realizado bajo condiciones de radiación controlada con cepas del cv. Tempranillo [Martínez-Lüscher et al. \(2014a\)](#), observaron un incremento de la concentración de antocianos extraíbles del mosto y de la intensidad de color de los vinos resultantes, principalmente en los tratamientos en los cuales las cepas fueron expuestas a dicha radiación a partir del cuajado.

Apenas existen referencias sobre el efecto de la radiación sobre el perfil de aminoácidos de las uvas. En lo que respecta a la incidencia de la radiación UV-B sobre el metabolismo de los de aminoácidos, [Gregar et al. \(2012\)](#), observaron que la radiación UV-B apenas incidía sobre la concentración de la mayoría de los aminoácidos analizados. Sin embargo, posteriormente, [Martínez-Lüscher et al. \(2014b\)](#) mostraron que, aunque el contenido total de aminoácidos libres no se vió afectado por la radiación, sí se observaron un aumento de los niveles de ácido gamma aminobutírico, y una disminución de treonina, isoleucina, metionina, serina y glicina en el mosto de las uvas expuestas a dicha radiación. El reciente estudio de [Guan et al. \(2017\)](#) efectuado en Burdeos (Francia) con las variedades Gamay Noir y Gamay Fréaux concluyó que el sombreado del racimo redujo significativamente la mayoría de los aminoácidos analizados, a excepción del ácido gamma aminobutírico y de la fenilalanina y, por tanto, modificó significativamente el perfil aminoacídico. Según estos autores, la magnitud del efecto dependió de la variedad y del tejido de la uva analizado, observándose una mayor disminución en los aminoácidos del hollejo que en los de la pulpa.

Los niveles de numerosos compuestos aromáticos de la uva también están influenciados por la exposición a la luz. La exposición de los racimos a la luz solar antes del envero favorece la síntesis de carotenoides en las uvas ([Razungles et al., 1993](#)) y la acumulación de norisoprenoides y monoterpenos, tanto libres como glicosilados, en vendimia ([Reynolds y Wardle, 1989b](#); [Gerdes et al., 2002](#); [Schneider et al., 2002](#); [Lee et al., 2007](#); [Skinkis et al., 2010](#)). En un trabajo realizado en Aude (Francia) en la cv

Shiraz, [Bureau et al. \(2000\)](#) observaron que las bayas de las vides expuestas al sol presentaban un mayor contenido de fenoles volátiles, compuestos terpénicos y C₁₃-norisoprenoides en comparación con las bayas procedentes de las vides sombreadas. Por otra parte, se ha observado que la exposición a la luz reduce la concentración de metoxipirazinas, aunque el momento de la exposición a la luz (antes o después del envero) influye en los niveles dichos compuestos en vendimia ([Hashizume y Samuta, 1999](#); [Koch et al., 2012](#)).

1.3.4. El clima de Extremadura

El clima de Extremadura, región situada en el extremo sur del continente europeo y separada del Atlántico por Portugal, está influenciado por las características térmicas y dinámicas de las masas de aire procedentes del Océano Atlántico. Por ello su clima es del tipo mediterráneo con influencia subtropical. De manera general, presenta un régimen térmico anual templado, con temperaturas medias en torno a los 16 °C, y un gradiente térmico que aumenta desde los 12 °C de media anual, que se observa en las altas sierras del norte, hasta los 18 °C del sector centro y sur de la región. Debido a las elevadas temperaturas y a la fuerte insolación registradas su mayor parte, la evapotranspiración constituye un factor determinante del alto déficit hídrico global de la región extremeña. Los meses estivales son muy calurosos y secos, los inviernos suaves, y la amplitud térmica presenta ciertos rasgos de continentalidad. Es de destacar en algunos sectores una insolación muy elevada, que ronda las 2.500 horas de sol anuales, o incluso las supera en los años más secos ([Font Tullot, 1956](#); [Sánchez Lorenzo, 2009](#)). De manera global, puede estimarse una precipitación media anual de 615 mm, oscilando entre los 350 mm y los más de 1000 mm de los sectores húmedos localizados a mayor altitud y orientados a barlovento.

1.4. Técnicas de control de la producción del viñedo

Las técnicas para reducir y controlar el rendimiento de las cepas se emplean desde la antigüedad, pues siempre se han asociado las uvas y los vinos de mejor calidad a los viñedos de bajo rendimiento productivo. Además, son numerosos los estudios que muestran cómo la maduración de la uva y su composición en vendimia están muy influenciados por el tipo de prácticas culturales llevadas a cabo en el viñedo ([Petrie y](#)

Clingeffer, 2006; Valdés et al., 2009; Diago et al., 2012b; Lee y Skinkis, 2013; Gamero, 2015; Talaverano, 2017).

Las técnicas vitícolas más comúnmente utilizadas para el control del rendimiento son la **poda**, el **despampanado**, el **aclareo de racimos** y el **deshojado**.

La **poda** de invierno se ha utilizado desde los comienzos de la viticultura como método de control de la producción de la uva para equilibrar el rendimiento del viñedo con el potencial del medio vitícola (Hidalgo, 2003). Sin embargo, una poda excesiva, que suprima un gran número de yemas, puede ocasionar una mayor fertilidad de aquellas que se han mantenido en la cepa, con el consiguiente desarrollo de las yemas ciegas. Esto produce un aumento del crecimiento vegetativo, con los efectos negativos sobre la calidad de la uva que este hecho conlleva (Chapman et al., 2004; Poni et al., 2004).

El **despampanado**, consiste en la supresión de pámpanos fructíferos de la cepa con el objetivo por un lado de reducir la producción y por otro, de disminuir la densidad de la cubierta vegetal con la consiguiente mejora del microclima del dosel vegetal. Esta práctica se suele aplicar en un estadio temprano del crecimiento (pámpanos con 15-25 cm de longitud) (Pool et al., 1978; Reynolds et al., 2005). Las investigaciones muestran que esta técnica tiene un marcado efecto sobre la concentración de azúcar, acidez y compuestos fenólicos (Reynolds et al., 2005; Sun et al., 2011; Sun et al., 2012). Debido al alto coste en mano de obra que implica su ejecución, en la actualidad se han ideado sistemas que permiten la mecanización de esta técnica (Morris y Oldridge, 2002).

El **aclareo manual** de racimos se aplica para ajustar el exceso de carga que se dejó en la poda y con ello equilibrar la cantidad de uva con la superficie foliar. Su efecto depende de la época y del nivel de intensidad con el que se aplique. En diferentes variedades de vid, se ha demostrado que mediante esta técnica es posible incrementar el contenido en azúcares, polifenoles y compuestos responsables del aroma de las bayas (García-Escudero et al., 1995; Guidoni et al., 2002; Hidalgo, 2003; Tardáguila et al., 2005; Reynolds et al., 2007; Gamero et al., 2014; Talaverano et al., 2016). Como variante al aclareo manual, el **aclareo químico** consiste en la aplicación de determinadas hormonas (giberelinas y etileno principalmente) al viñedo. Los resultados obtenidos con la aplicación de esta técnica son heterogéneos y varían en función de la variedad y de las dosis del tratamiento aplicado (May, 2004; Avizcuri-Inac et al., 2013). Weaver (1960)

observó efectos acumulativos de reducción del vigor y fertilidad en campañas posteriores a la aplicación del tratamiento químico.

El **deshojado clásico o tradicional**, consiste en la supresión parcial de las hojas basales de los pámpanos y se ha empleado para incrementar la aireación y la exposición de los racimos a la radiación solar, y así mejorar la calidad de las uvas ([Dokoozlian y Kliever, 1996](#); [Haselgrove et al., 2000](#); [Bergqvist et al., 2001](#)), facilitar el control de enfermedades criptogámicas ([Bledsoe et al., 1988](#); [Smart, 1985](#); [Smart y Robinson, 1991](#); [Percival et al., 1994](#); [Reynolds et al., 1996](#); [Petrie et al., 2000](#)) e incrementar la eficacia de los tratamientos fitosanitarios ([Gubler et al., 1991](#)). Tradicionalmente, el deshojado se realiza tras el momento fenológico del cuajado o del envero, cuando el impacto sobre el rendimiento es menor ([Intrigliolo y Lakso, 2009](#)) y el tamaño potencial de la baya ya está establecido ([Ojeda et al., 2001](#)). Frente a este deshojado clásico, surge el **deshojado precoz** que consiste en la eliminación de hojas basales en la época de floración ([Poni et al., 2005](#); [Poni et al., 2006](#)). Mediante la supresión de estas hojas, se pretende eliminar o al menos disminuir la principal fuente de nutrientes que garanticen el cuajado ([Quinlan y Weaver, 1970](#)).

1.5. Efecto del deshojado precoz sobre la producción y la composición de la uva y vino

Los trabajos que analizan el efecto de la aplicación del deshojado precoz, realizados principalmente en climas relativamente fríos y húmedos y en variedades de excesivo vigor, muestran una disminución de la tasa de cuajado, con la consiguiente disminución de la compacidad del racimo y del rendimiento, traducido en una mejora de la calidad de la cosecha ([Poni et al., 2006](#); [Intrieri et al., 2008](#); [Diago et al., 2010](#); [Poni y Bernizzoni, 2010](#); [Sabbatini y Howell, 2010](#); [Diago et al., 2012a](#); [Diago et al., 2012b](#); [Otero, 2015](#)). Por otra parte, diversos trabajos revelan que el efecto de esta técnica depende de múltiples factores como el cultivar ([Lee y Skinkis, 2013](#)), el momento de aplicación ([Intrieri et al., 2008](#); [Gatti et al., 2012](#); [Poni et al., 2013](#); [Sternad Lemut et al., 2013](#)) e intensidad con la que se efectúe ([Risco et al., 2014](#)). De manera general, una mayor intensidad tendrá mayores efectos sobre la planta y las características de la vendimia obtenida.

Otra consecuencia del deshojado precoz es un aumento de la porosidad de la vegetación y la inmediata modificación del área foliar de la cepa. A este respecto hay que

tener en cuenta que dependiendo de la intensidad con que se lleve a cabo el deshojado y de las características meteorológicas del año, el área foliar de las cepas deshojadas puede llegar a igualarse al de las cepas control (no deshojadas) a lo largo del ciclo de la vid. Por otra parte hay que considerar que varios trabajos han demostrado que las prácticas empleadas para la modificación del dosel vegetal provocan un aumento de la exposición de los racimos a la luz, ejerciendo una influencia importante sobre la acumulación de metabolitos secundarios, como son los compuestos fenólicos y los aromáticos (Poni et al., 2006; Diago et al., 2010; Vilanova et al., 2012c; Poni et al., 2013; Otero, 2015).

Como consecuencia de la disminución de la compacidad del racimo y del aumento de la porosidad del dosel vegetal se produce una modificación del microclima del racimo, mejorando su aireación y su estado sanitario (Poni et al., 2009; Tardáguila et al., 2010).

En un estudio realizado en cultivares altamente productivos (Sangiovese y Trebbiano) desarrollado en Piacenza (Italia), Poni et al. (2006) observaron en las uvas procedentes de cepas del cv. Sangiovese a las que se aplicó un deshojado precoz, aumentos en el contenido en sólidos solubles totales y una mayor acidez total, y en las procedentes del cv. Trebbiano, incrementos del ácido tartárico y disminución del ácido málico. Al aplicar esta técnica en las variedades Graciano y Cariñena en La Rioja, Tardáguila et al. (2010), no observaron un efecto significativo del deshojado precoz sobre el contenido en sólidos solubles totales frente a las uvas de las cepas control. Sin embargo, si observaron una disminución en el contenido en ácido málico en las cepas deshojadas vs control.

En el caso de los compuestos fenólicos, y debido a que las diferentes familias se sintetizan en distintas etapas de desarrollo de la baya, el momento de aplicación del deshojado incide de manera diferente en la síntesis de dichos compuestos (Sternad Lemut et al., 2013). En su estudio, Gatti et al. (2012) mostraron que el deshojado realizado en prefloración aumentaba el contenido de fenoles totales y de antocianos del cv. Sangiovese. Respecto a los flavonoles, Sternad Lemut et al. (2011) observaron, en uvas Pinot Noir procedentes de cepas deshojadas en prefloración cultivadas en Eslovenia, un incremento de la concentración de estos compuestos durante los primeros estadios del ciclo de maduración y una disminución en el momento de vendimia. En la variedad Tempranillo cultivada en La Rioja, se observó que, en las uvas vendimiadas, la concentración de flavonoles se incrementaba en la baya cuando se aplicaba el deshojado precoz (Diago et al. 2012a).

El efecto positivo del deshojado precoz sobre la composición volátil de uvas y vinos ha sido mostrado por diferentes investigadores (Karoglan et al., 2008; Bubola et al., 2009; Vilanova et al., 2012c; Otero, 2015). En un trabajo desarrollado en la Rioja con el cultivar Tempranillo, Vilanova et al. (2012b) observaron que el deshojado precoz inducía una reducción significativa de los compuestos C6 y un incremento de las concentraciones de acetatos en los vinos, mientras que, de manera general, la concentración total de alcoholes, ésteres, ácidos volátiles y terpenos no se vio afectada. El octanoato de etilo, el acetato de 2-feniletilo, el acetato de isoamilo y el ácido hexanóico, principalmente descriptores de olores frutales y florales, mostraron niveles más altos en los vinos procedentes de cepas deshojadas en comparación con los de cepas control. Un estudio reciente llevado a cabo en Italia, mostró que el deshojado precoz efectuado en el cv. Semillon ejercía un efecto significativo sobre los precursores aromáticos glicosilados, en particular los terpenoles y los norisoprenoides glicósidos, que incrementaban su concentración en uvas procedentes de cepas sometidas a un deshojado precoz, hecho que se vio reflejado en una mayor intensidad de notas afrutadas en los vinos de los tratamientos deshojados frente al control (Alessandrini et al., 2018).

Una ventaja muy importante de esta técnica es que puede ser mecanizada, hecho que ha sido objeto de investigaciones ya que pueden verse reducidos, tanto la mano de obra como los costes de producción (Diago et al., 2010; Poni y Bernizzoni, 2010; Sabbatini y Howell 2010; Filippetti et al., 2011; Tardáguila et al., 2012).

1.6. La variedad Tempranillo

Posiblemente, la referencia más antigua sobre el cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) sea la del libro de Alexandre (Poema de Alejandro Magno, Mester de Clerecía, siglo XIII). Posteriormente, en “El Libro del Viticulor” de Abela y Sainz de Andino del 1885, ya se recogen las variedades denominadas Temprana Blanca, Temprana Negra, Tempranilla, Tempranillo Blanco, Tempranillo de Peralta o de Rioja y Temprano entre otras.

En cuanto a su origen, García de los Salmones (1914) manifiesta que se trata de una variedad cuyo origen puede ser la zona del Ebro (Rioja y Aragón). Galet (1988) la considera una variedad de maduración temprana, cultivada desde tiempos muy antiguos en La Rioja, admitiendo que probablemente es propia y peculiar de esta zona. Este autor plantea la posibilidad de su origen en la Borgoña, por la similitud con el período

vegetativo de la Pinot Noir y aunque lógicamente sean distintas, su dispersión pudo realizarse a través de la ruta jacobea por los monjes de Cluny y Cîteaux.

En la península ibérica posee un número elevado de sinonimias: Tempranillo de Rioja, Aragonés, Cencibel (La Mancha), Chinchillana, Escobera, Tinta de Madrid (Madrid), Tinta de Toro (Zamora), Tinta del País (D.O. Ribera del Duero), Tinta Fina, Tinta Roriz (Portugal), Tinto Aragonés (Aragón) y Ull de Llebre (Cataluña) ([Cabello et al., 2003](#)).

Actualmente, es uno de los cultivares más extendidos en España, con cerca del 21 % de la superficie total del viñedo español, sólo superada por Airén (23 %) ([MAPAMA, 2017b](#)). Esta variedad, que está presente en 28 de las 54 D.O. y en 27 de las 49 comarcas productoras de Vino de la Tierra, puede considerarse la variedad tinta más representativa de España. En Extremadura, supone alrededor del 86 % del total de la superficie cultivada con variedades tintas ([MAPAMA, 2017b](#)). También se cultiva en otros países como por ejemplo Portugal, Francia, Argentina y Estados Unidos.

En su tratado de viticultura, [Hidalgo e Hidalgo \(2011\)](#) la definen como una variedad vigorosa, que se adapta a todo tipo de suelos, poco sensible a las heladas primaverales y los ácaros y en cambio muy sensible a los vientos cálidos de primavera, al oídio y al mildiu. Debido a su amplia distribución en España, es cultivada en zonas de características edafológicas y climáticas son muy diferentes. Este hecho induce variaciones significativas del desarrollo de su ciclo fisiológico, que se correlacionan con las diferencias en la duración del ciclo de maduración y, posteriormente, en la fecha de la vendimia.

Cuando investigadores de diferentes zonas vitícolas españolas analizaron la incidencia de las características edafoclimatológicas de esas zonas sobre el ciclo vegetativo de las cepas y la composición de las uvas en vendimia de esta variedad, observaron la gran incidencia de los factores climáticos en las fechas en las que ocurren los momentos más representativos del ciclo, pudiendo existir incluso retrasos de más de dos semanas en la fecha de maduración entre los diferentes viñedos procedentes de los diferentes terroirs, y en las uvas maduras se encontró una alta y significativa correlación entre el índice heliotérmico y la acidez, pero no con los niveles de azúcar ([González-San José et al., 2014](#)).

Las uvas de esta variedad se caracterizan por presentar un elevado pH, superior muchas veces a 3,5 (Esteban et al., 1999; Hernández-Orte et al., 1999) debido principalmente, entre otros factores, a su alta capacidad de absorción de potasio (Cuevas, 2001).

El perfil fenólico de la variedad Tempranillo ha sido muy estudiado (Hebrero et al., 1988; González-San José et al., 1990; Cacho et al., 1992; Arozarena et al., 2002). En su trabajo, Guerrero et al. (2009), al analizar las uvas de esta variedad procedentes de cepas cultivadas en un clima semiárido (Jerez de la Frontera), hallaron que los glucósidos de malvidina y miricetina, la catequina y el ácido caftárico, fueron los compuestos fenólicos mayoritarios. Resultados similares halló Talaverano (2017) en uvas procedentes de cepas regadas en Extremadura, aunque en este caso el ácido cumárico fue el ácido fenólico más abundante. En lo que respecta al color, los estudios de Gómez-Cordovés et al. (1995) y Monagas et al. (2006) mostraron que la intensidad del color de los vinos de esta variedad viene determinada principalmente por las concentraciones de compuestos de delfinidina y petunidina, hallazgos que fueron confirmados por Gamero et al. (2018).

En relación a la composición nitrogenada, Hernández-Orte et al. (1999) observaron que la prolina, arginina, histidina y glutamina representaban aproximadamente el 70 % del total de aminoácidos libres hallados en las uvas Tempranillo procedentes de cepas cultivadas en Somontano (Aragón, España), en tanto que las menores concentraciones correspondían a la glicina, isoleucina, fenilalanina y lisina. Este perfil aminoacídico ha sido confirmado por estudios realizados en La Rioja (López et al., 2012; Garde Cerdán et al., 2014; Garde Cerdán et al., 2016) y en Extremadura (Talaverano, 2017; Valdés et al., 2019). Además, en todas estas investigaciones se ha mostrado que, aunque las concentraciones de los aminoácidos individuales varían de una campaña a otra, el perfil permanece constante.

La relación entre los aminoácidos arginina y prolina resulta interesante, ya que el primero es un aminoácido que contribuye en un elevado porcentaje al YAN, en tanto que el segundo no es asimilable por las levaduras. A este respecto, en el estudio anteriormente citado Hernández-Orte et al. (1999) hallaron que el valor de arginina era más alto que el de la prolina, hecho que concuerda con los resultados obtenidos por Huang y Ough (1991). En consecuencia, el ratio prolina/arginina tiene, por lo general, valores inferiores a 1. Este hecho puede considerarse una característica peculiar de esta variedad, ya que

este resultado solamente se halla de forma ocasional en la variedad Pinot Noir. (Huang y Ough, 1991; Spayd y Andensen-Bagge, 1996).

Respecto a la composición volátil de los vinos de la variedad Tempranillo, los estudios realizados por Vilanova et al. (2012c) y Talaverano et al. (2016), llevados a cabo en La Rioja y Extremadura respectivamente, hallaron como familia mayoritaria a la formada por los alcoholes superiores (92,4 %, principalmente 2-+3-metil-1-butanol), seguida de los ésteres etílicos (3,6 %, principalmente lactato de etilo y succinato de etilo en Rioja y Extremadura respectivamente), compuestos C₆ (2,4 %, principalmente 1-Hexanol), acetatos (1,2 %, principalmente 2-fenil-acetato y acetato de isoamilo en Rioja y Extremadura respectivamente), ácidos volátiles (0,3 %, principalmente los ácidos hexanóico y butanodioico en Rioja y Extremadura respectivamente) y en último lugar por los terpenos (0,02 %, principalmente linalol). En un estudio sobre la composición volátil de vinos monovarietales procedentes de diferentes variedades cultivada en zonas del noreste de España (Valle del Ebro) Ferreira et al. (2000) observaron que los vinos Tempranillo presentaban un mayor contenido de eugenol, guayacol, acetato de isoamilo y β -feniletil acetato y menores concentraciones de 2,3-butanodiona, linalol, ácido isovalérico, isobutanol, alcohol isoamílico, β -feniletanol y metionol en comparación con los elaborados a partir de Garnacha, Cabernet Sauvignon y Merlot. Estudios similares llevado a cabo por Vilanova et al. (2013), en el noroeste de España, mostraron que los vinos Tempranillo poseían mayores concentraciones de (Z)-3 hexen-1-ol y acetato de isoamilo que los vinos de Merlot, Cabernet Sauvignon y Pinot Noir elaborados en la misma región.

A nivel sensorial, los vinos de esta variedad se han descrito como vinos con una alta intensidad aromática, en la destacan los descriptores “bayas rojas”, “bayas negras” y “floral” como los principales atributos aromáticos, mientras que, en la fase gustativa, “alcohólico” y “herbáceo” fueron los descriptores más importantes (Etaio et al., 2008). En su estudio, Gamero (2015) definió los vinos monovarietales del cv. Tempranillo de Extremadura, como vinos con alta intensidad de color y con tonos cereza, violeta, aromas con matices a frutos rojos, herbáceo, floral, regaliz, láctico y buena persistencia, y a nivel gustativo los definió como vinos tánicos, con estructura, alcohólicos, con acidez, tonos amargos, vinos equilibrados y persistentes. En un estudio posterior, Talaverano et al. (2016) observaron que los valores actividad odorífera (VAO) más elevados correspondían

al hexanoato de etilo, acetato de isoamilo y octanoato de etilo, siempre por encima de los umbrales de percepción.

2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Estudiar el efecto del deshojado precoz sobre el comportamiento agronómico, la composición de la uva y del vino de la variedad Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) cultivada en Extremadura.

2.2. Objetivos específicos

- a) Determinar las características microclimáticas del viñedo experimental de la variedad Tempranillo perteneciente al CICYTEX.
- b) Estudiar el efecto del deshojado precoz sobre el desarrollo vegetativo y los componentes de la producción de las cepas del cv. Tempranillo.
- c) Examinar la incidencia del deshojado precoz sobre la evolución de la composición físico-química de las uvas del cv. Tempranillo durante el periodo de maduración y en vendimia.
- d) Evaluar el efecto del deshojado precoz sobre los parámetros enológicos generales, la composición aminoacídica de las uvas y el perfil fenólico de los hollejos del cv Tempranillo vendimiadas con similar contenido en sólidos solubles totales (°Brix).
- e) Estudiar la influencia del deshojado precoz sobre los parámetros enológicos generales, la composición fenólica, las características cromáticas y el perfil aromático de los vinos del cv Tempranillo.
- g) Analizar el efecto del deshojado precoz sobre las características sensoriales de los vinos del cv. Tempranillo.

3

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Viñedo experimental. Características edafoclimáticas

3.1.1. Localización y temporalidad del ensayo. Material vegetal

El ensayo se llevó a cabo en un viñedo experimental situado en Guadajira (Badajoz), (38°51'N; 6°40'W; altitud 198 m) y se desarrolló durante los años 2009-2011. La parcela tiene una dimensión de 1,8 ha y pertenece al Instituto de Investigaciones Agrarias Finca La Orden-Valdesequera, del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), propiedad de la Junta de Extremadura.

Las cepas del cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) clon RJ-43, se plantaron en el año 2001 sobre portainjertos Richter 110/151, con un marco de plantación de 1,20 m entre cepas y 2,50 m entre filas lo que supone una densidad de 3.333 cepas/ha. El sistema de formación es en espaldera, en cordón bilateral, con una altura de tronco de 60 cm y posicionamiento vertical de los brotes (VSP). La altura del sistema de conducción es de 1,5 m y la orientación de las filas es noroeste-sureste. El sistema de poda de fructificación fue de 12 yemas totales por cepa distribuidas en 6 pulgares por cepa (3 hacia cada lado) y dos yemas por pulgar.

En las 3 campañas de estudio (2009-2011), se realizó el manejo de la vegetación (despioje, guiado y despunte de los pámpanos), acondicionamiento del suelo, control de malas hierbas (pases de cultivador, rodo y aplicación de herbicida) de acuerdo a los usos habituales de la zona. También se efectuó el control de plagas y enfermedades necesarios mediante la aplicación de los fitosanitarios correspondientes según las recomendaciones de las casas suministradoras.

La determinación del estado fenológico se efectuó semanalmente según la metodología descrita por [Coombe \(1995\)](#), visualizando el estado más y menos avanzado, y el más representativo (en el que se encontraban al menos el 50 % de las cepas controladas) de cada una de las parcelas elementales estudiadas.

La Tabla 3.1 muestra las fechas en las que se alcanzaron los principales estados fenológicos en las 3 campañas de estudio.

Tabla 3.1. Estados fenológicos expresados en días del calendario juliano (día del año, DDA).

Año	Brotación	Floración	Cuajado	Envero	Caída de hoja
2009	79	134	146	196	329
2010	85	137	152	200	325
2011	83	129	136	192	329

3.1.2. Caracterización meteorológica

La caracterización del meteorológica durante los años 2009, 2010 y 2011 se ha llevado a cabo a partir de los datos meteorológicos recogidos por la estación agroclimática (CR10X datalogger; Campbell Scientific, Shephed, Reino Unido) integrada dentro de la Red de Asesoramiento al Regante de Extremadura (REDAREX), ubicada en el viñedo experimental.

Los datos registrados de temperatura y precipitaciones se muestran en la Figura 3.1.

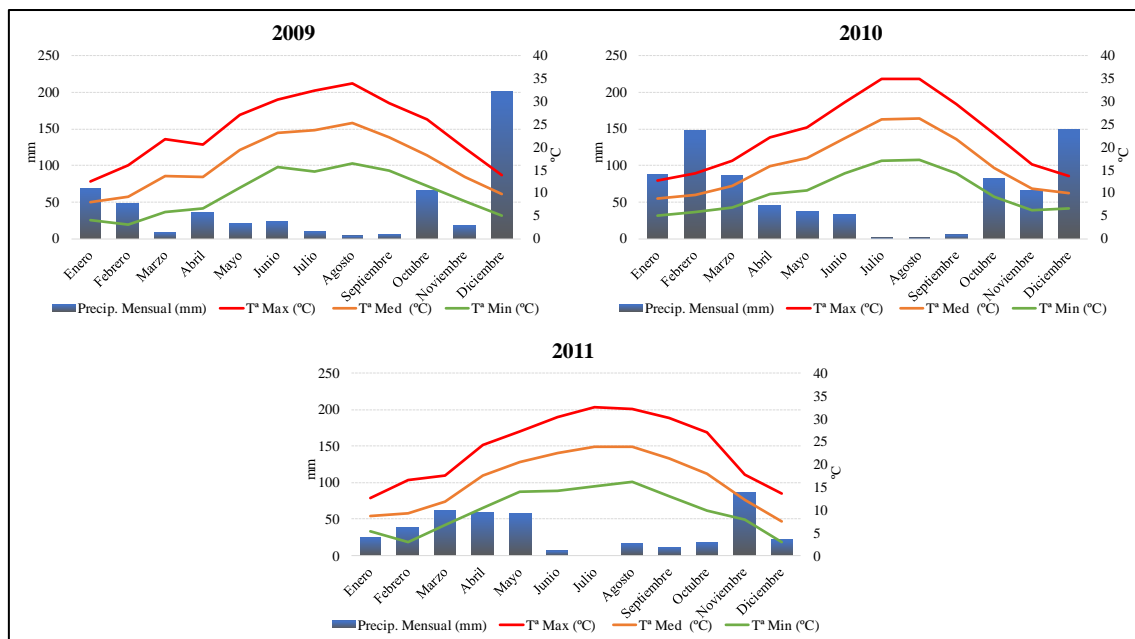


Figura 3.1. Datos pluviométricos y termométricos (máximos, medios y mínimos) resgistrados en la estación meteorológica situada en el viñedo experimental durante los años 2009-2011.

En la Tabla 3.2 se muestran los datos meteorológicos medios del ciclo vegetativo-productivo de las cepas (V-P; 1 de abril al 30 de septiembre), los datos medios anuales de los 3 años que abarca el estudio (2009-2011), y los datos medios registrados por la estación agroclimática durante el periodo (2004-2011).

Tabla 3.2. Datos climáticos registrados en el viñedo experimental del cv. Tempranillo correspondientes al periodo vegetativo-productivo (V-P, abril a septiembre) y anuales durante los años 2009-2011. Datos climáticos del periodo 2004-2011.

Año	Parámetro	Periodo vegetativo-productivo (V-P)						Valor medio V-P	Valor medio Anual
		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre		
2009	Tª Máxima (°C)	20,5	27,1	30,5	32,3	34,0	29,2	28,9	23,6
	Tª Media (°C)	13,5	19,4	23,2	23,8	25,4	21,9	21,2	16,6
	Tª Mínima (°C)	6,7	11,1	15,6	14,8	16,5	14,9	13,3	9,8
	Precipitaciones (mm)	35,8	21,0	23,4	10,6	4,2	6,8	101,8	515,4
	ITE (°C)	107,3	282,1	391,8	419,8	474,2	362,4	2037,5	2456,2
2010	Tª Máxima (°C)	22,2	24,4	29,8	35,0	34,8	29,5	29,3	22,7
	Tª Media (°C)	15,9	17,6	22,1	26,2	26,3	21,8	21,6	16,3
	Tª Mínima (°C)	9,7	10,6	14,3	17,1	17,2	14,3	13,9	10,2
	Precipitaciones (mm)	45,6	37,4	33,4	0,2	1,2	5,2	123,0	739,8
	ITE (°C)	179,9	233,0	361,3	497,5	496,5	358,0	2126,0	2308,3
2011	Tª Máxima (°C)	24,3	27,2	30,4	32,5	32,2	30,2	29,5	23,5
	Tª Media (°C)	17,5	20,5	22,5	23,9	23,9	21,3	21,6	16,4
	Tª Mínima (°C)	10,5	14,0	14,2	15,1	16,2	13,1	13,9	9,9
	Precipitaciones (mm)	58,0	57,2	7,0	0,0	16,2	12,0	150,4	400,4
	ITE (°C)	222,2	328,7	369,3	428,2	440,7	348,1	2137,1	2456,3
2004-2011	Tª Máxima (°C)	22,2	26,0	30,3	33,3	33,5	29,5	29,1	23,3
	Tª Media (°C)	15,5	19,0	22,6	24,7	25,0	21,6	21,4	16,4
	Tª Mínima (°C)	8,9	11,8	14,7	15,8	16,4	14,1	13,6	9,8
	Precipitaciones (mm)	47,2	41,3	19,4	9,0	11,4	18,0	146,2	540,6
	ITE (°C)	166,8	276,3	375,4	450,3	462,9	353,6	2085,4	2351,3

ITE: Integral térmica eficaz (acumulación de grados día en base 10 °C).

Para efectuar la caracterización climática del viñedo se calcularon los siguientes índices climáticos vitícolas:

- **Integral térmica eficaz (ITE)** o grados día acumulados (GDD) (Winkler et al., 1974).
- **Índice heliotérmico (HI)** (Huglin, 1978).
- **Índice de frescor nocturno (CI)** (Tonietto y Carbonneau, 2004).
- **Índice de sequía (DI)** (Tonietto y Carbonneau, 2004).

La ITE proporciona la acumulación de calor y se emplea para describir la idoneidad del crecimiento de los cultivos en diferentes climas. Se calcula como la suma de las temperaturas medias superiores a 10 °C durante el periodo vegetativo-productivo de la vid (01 de abril-30 de septiembre) según la Ecuación 1.

Ecuación 1. Integral térmica eficaz (ITE, °C).

$$ITE = \sum_{01.04}^{30.09} (\bar{T}_d - 10)$$

T_d Temperaturas medias diarias

El HI, que se calcula según la Ecuación 2, da información sobre el grado del potencial heliotermal (Tonietto y Carbonneau, 2004).

Ecuación 2. Índice heliotérmico (HI).

$$HI = \sum_{01.04}^{30.09} \left(\frac{[(T - 10) + (Tx - 10)]}{2} \right) d$$

T : Temperatura media diaria.

Tx : Temperatura máxima diaria.

d : Coeficiente dependiente de la latitud; en este caso, su valor es 1 pues la latitud donde se encuentra el viñedo experimental es menor a 40 °.

El índice CI se corresponde con la temperatura mínima media registrada durante el mes previo al que se produce la maduración de la uva (agosto en el viñedo experimental

en estudio). Este índice, combinado con HI, facilita una buena discriminación del clima de la zona, tanto de las condiciones heliotérmicas globales durante el ciclo vegetativo de la uva, como del frescor nocturno durante el período de maduración.

El índice DI está basado en una adaptación del índice del potencial del balance hídrico del suelo de [Riou et al. \(1994\)](#) y permite la caracterización de la componente hídrica del clima en una región vitícola, considerando la demanda climática de un viñedo estándar (transpiración potencial), la evaporación desde el suelo desnudo, y las precipitaciones sin tener en cuenta las pérdidas por escorrentía superficial o drenaje. Indica la disponibilidad potencial de agua en el suelo en relación con el nivel de sequía en una región. Se calcula según la ecuación 3.

Ecuación 3. Índice de sequía (DI).

$$DI = W = W_0 + P - T_v - E_s$$

W: Estimación de la reserva hídrica del suelo al momento de la cosecha.

W_0 : Disponibilidad de agua en el suelo al comienzo del ciclo del cultivo, estimada en 200 mm.

P: Precipitación total durante el período (abril-septiembre) (mm).

T_y : Transpiración potencial del viñedo (mm) ($ETP \times k$, donde ETP = evapotranspiración potencial estimada por [Penman \(1948\)](#), k = coeficiente estimado en función de la intercepción de la radiación solar). El coeficiente “ k ” se incrementa según el estado de desarrollo del cultivo $k = 0,1$ para abril, $0,3$ para mayo y $0,5$ para el periodo junio-septiembre.

E_s = evaporación directa a partir del suelo (mm) ($ETP/N \times (1-k) \times JPm$, donde N = número de días del mes y JPm = precipitaciones del mes en mm/5).

3.1.3. Características edafológicas

El análisis edafológico del viñedo se realizó en el Laboratorio Agroalimentario y de Residuos de Extremadura (LAR, Cáceres). Para ello se tomaron muestras en 16 puntos distribuidos de forma homogénea sobre la superficie de la parcela y se determinaron las características físico-químicas del suelo del viñedo a diferentes profundidades (0-30 cm y 30-60 cm). Las características físico-químicas del suelo se muestran en la Tabla 3.3. A la vista de los resultados obtenidos, los suelos han sido clasificados como fluvisoles ([USDA, 1992](#)), sin otros horizontes de diagnóstico, de textura predominantemente franca con bajo contenido en materia orgánica (<1%) y nutrientes y minerales y pH ligeramente neutro.

Tabla 3.3. Caracterización edafológica del viñedo experimental del cv. Tempranillo.

Parámetro	Profundidad (0-30 cm)	Interpretación	Profundidad (30-60 cm)	Interpretación
Arena (%)	48,0	Textura	43,5	Textura
Limo (%)	30,2	franca-	35,7	franca-
Arcilla (%)	21,8	franco-arenosa	20,8	franco-arenosa
Conductividad eléctrica (mmhos/cm)	0,1	No salino	0,2	No salino
pH	7,1	Neutro	6,8	Neutro
Materia orgánica oxidable (%)	0,8	Muy bajo	0,4	Muy bajo
Carbonato total CaCO ₃ (%)	<1	Muy bajo	<1	Muy bajo
Relación C/N	20,7	Muy alto	22,1	Muy alto
Intercambio catiónico (meq/100g)	9,8	Bajo	11,9	Medio
Nitrógeno total (Kjeldahl) (%)	0,02	Muy bajo	0,01	Muy bajo
P asimilable (Olsen) (ppm)	23,5	Normal	5,1	Muy bajo
K ⁺ (ppm)	70,2	Muy bajo	50,7	Muy bajo
Na ⁺ (ppm)	124,2	Bajo	149,5	Normal
Mg asimilable (ppm)	151,0	Bajo	163,2	Bajo
Ca asimilable (ppm)	667,3	Bajo	581,2	Muy bajo

3.2. Diseño experimental y tratamientos aplicados

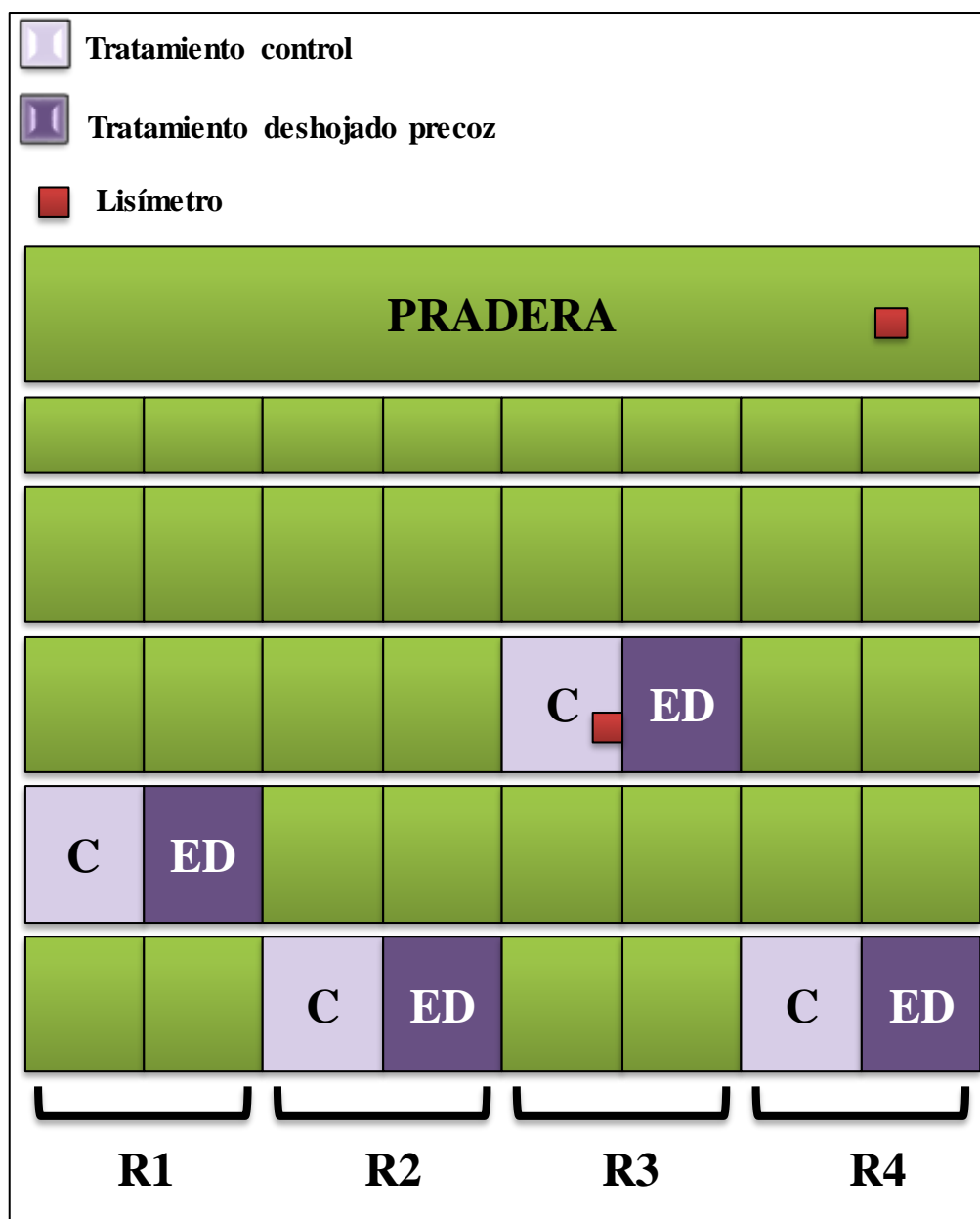
Se establecieron dos tratamientos experimentales:

- Control (C). Cepas sin deshojar.
- Deshojado precoz manual (ED).
 - En 2009 se eliminaron las primeras siete hojas basales de cada pámpano al comienzo del estado fenológico de pre-floración, fase fenológica 19 (Coombe, 1995).
 - En 2010 y 2011, además de esas primeras siete hojas, se eliminaron las hojas de los brotes secundarios presentes en los siete primeros nudos de las cepas (Fig. 3.2) en el mismo estado fenológico que en el 2009.



Figura 3.2. Detalle de cepas deshojadas al comienzo de la floración en el viñedo experimental cv. Tempranillo.

El diseño experimental fue en bloques al azar con cuatro repeticiones por tratamiento, lo que supuso un total de 8 parcelas elementales (Fig. 3.3). Cada parcela elemental constaba de 108 cepas, dispuestas en 6 filas de 18 cepas cada una. De las cuatro filas centrales, dos de ellas se emplearon para la realización de los análisis destructivos durante los muestreos de maduración de las uvas y las otras dos filas se utilizaron para evaluar el crecimiento vegetativo, la producción y sus componentes. De cada parcela experimental se excluyeron las dos filas exteriores para evitar la posible influencia de las filas contiguas con tratamientos diferentes.



C: Tratamiento no deshojado.
 ED: Tratamiento deshojado.
 R1-R4: Repeticiones experimentales

Figura 3.3. Diseño experimental de los tratamientos llevados a cabo en el viñedo experimental del cv. Tempranillo durante las campañas 2009-2011.

La Tabla 3.4 expone las fechas de realización de la práctica del deshojado precoz en las diferentes campañas de estudio.

Tabla 3.4. Volumen de agua de riego aplicado, período de riego y fechas de aplicación del deshojado y de vendimia de los diferentes tratamientos experimentales (campañas 2009-2011) expresados en días del calendario juliano (día del año, DDA).

Año	Volumen de agua de riego (mm)	Periodo de riego (inicio-fin) (DDA)	Fecha de deshojado (DDA)	Fecha de vendimia (DDA)	
				Control (C)	Deshojado precoz (ED)
2009	666,6	140-280	132	244	237
2010	597,3	176-281	137	256	243
2011	483,6	172-284	123	243	230

Las cepas de ambos tratamientos (C y ED) se regaron mediante goteros autocompensantes de 4 L/h, con una separación entre goteros de 0,6 m. El volumen de agua aplicado en ambos tratamientos fue el necesario para mantener la plantación sin limitaciones hídricas bajo las condiciones edafoclimáticas de la parcela de estudio, mediante la reposición del 100 % de evapotranspiración del cultivo (ET_c). En ambos tratamientos el riego se aplicó mediante un programador de riego (Agronic 4000, Sistemas Electronics Progres, S.A.) y electro-válvulas de campo y se contabilizó el agua aplicada con un medidor de caudal instalado en cada parcela elemental. El consumo de agua se calculó con un lisímetro de pesada instalado en la parte central del viñedo experimental (datos técnicos del lisímetro y cálculos de ET_c descritos en [Picón-Toro et al. \(2012\)](#)). Los volúmenes de agua aplicados al viñedo en los años de estudio se muestran en la Tabla 3.4.

El estado hídrico de la cepa se determinó mediante las medidas semanales de potencial hídrico del tallo (Ψ_t) a partir de la brotación, desde que las hojas fueron lo suficientemente grandes como para hacer mediciones, hasta la vendimia. La medida se realizó en dos plantas representativas por parcela elemental y dos hojas por planta al mediodía solar. Las hojas elegidas para las mediciones de Ψ_t fueron de la misma edad y tipo, situadas en la parte norte y sombreada de la vid, introduciéndolas en bolsas de aluminio plastificadas y cerrándolas herméticamente dos horas antes de la medición ([Shackel et al., 1997](#)). La medida del potencial hídrico se realizó con una cámara de presión (Modelo de humedad del suelo Corp., Santa Bárbara, CA, EE.UU.). Para evaluar el estado hídrico de la vid se calculó el valor promedio de las mediciones de Ψ_t realizadas desde brotación hasta la cosecha.

3.3. Evaluación de parámetros agronómicos

3.3.1. Evolución del desarrollo vegetativo y determinación del área foliar total media

En las tres campañas del estudio, se determinó el área foliar total inicial (AFT_i), medida justo antes de la aplicación del tratamiento de deshojado precoz y el área foliar total media (AFT_m), calculada como el valor medio de tres medidas realizadas en enero, mitad de ciclo (primera quincena de agosto) y vendimia. Las medidas se efectuaron en dos cepas por parcela elemental (8 cepas por tratamiento). Dichas medidas se realizaron justo al atardecer, bajo radiación difusa con un analizador de cubierta vegetal LAI-2000 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) según la metodología descrita por [Uriarte et al. \(2012\)](#).

3.3.2. Determinación del área foliar eliminada

En el momento de efectuar el deshojado, se estimó el área foliar eliminada (AFE) según la metodología puesta a punto por nuestro grupo de investigación ([Blanco et al., 2010](#)) consistente en relacionar el peso de la materia fresca eliminada con su correspondiente área foliar. En cada una de las campañas, se deshojaron por completo 12 cepas y en el laboratorio se pesaron las hojas de cada una de las plantas en una balanza de precisión (Precisa 2200C, Precisa Gravimetrics, AG). En el laboratorio se determinó el área de hojas eliminadas en cada una de las cepas con un medidor de área foliar (LI-3100C Area Meter, Li-Cor Bioscience, Inc.). Las relaciones obtenidas entre peso y área foliar en las diferentes campañas se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Correlación obtenida entre el peso de hoja y el área foliar durante las campañas 2009-2011.

Año	Ecuación	R ²
2009	Área foliar (cm ²)= 24, 91 x Peso fresco de hoja (g) + 2761,0	0,9718
2010	Área foliar (cm ²)= 33, 71 x Peso fresco de hoja (g) + 1118,2	0,9955
2011	Área foliar (cm ²)= 31,47 x Peso fresco de hoja (g) + 1792,3	0,9766

Cada año de ensayo, una vez realizada la calibración, se determinó el peso de las hojas correspondiente al área foliar eliminada de 10 cepas en cada repetición del ensayo (40 cepas en total) y a este peso de materia fresca se le aplicó la relación obtenida en la

calibración (Tabla 3.5), De este modo se determinó el área foliar eliminada en cada parcela elemental correspondiente a cada año de ensayo.

3.3.3. Número de botones florales por inflorescencia

El número de botones florales por inflorescencia (número de flores por racimo) se estimó según el método no destructivo descrito por [Poni et al. \(2006\)](#) en el estado fenológico 19 ([Coombe, 1995](#)) (Fig.3.4). Para calibrar este método se seleccionaron y marcaron 15 racimos repartidos entre las cepas de las filas reservadas para análisis de cada tratamiento. Se realizaron fotografías perpendiculares a cada uno de los racimos sobre un fondo negro justo antes del proceso de antesis mediante una cámara fotográfica réflex digital (Cyber-shot DSC-F828, Sony Corporation). En estos racimos se determinó el número de botones florales fotografiados y el número de botones florales reales (conteo destructivo), obteniéndose así para los diferentes años del estudio las relaciones mostradas en la Tabla 3.6. Posteriormente, en cada año, a partir de la relación correspondiente, se determinó el número de botones florales de los racimos de las cepas de cada tratamiento, en 10 racimos por parcela elemental.

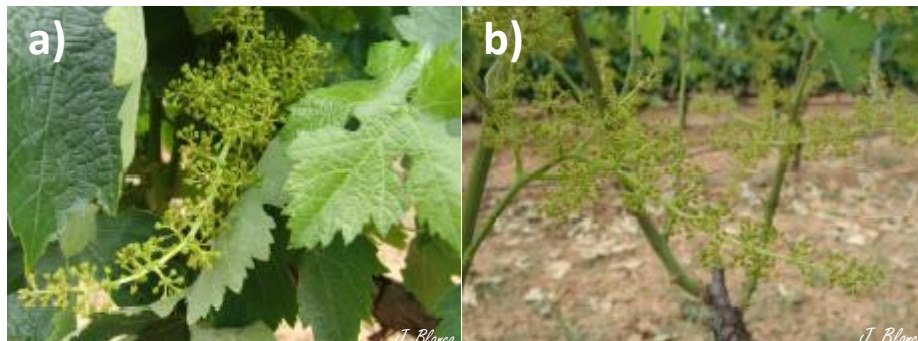


Figura 3.4. Racimo en estado fenológico de prefloración (estado 19, según [Coombe \(1995\)](#)): a) Tratamiento control (C); b) Tratamiento deshojado precoz (ED).

Tabla 3.6. Correlación lineal obtenida entre el número de botones florales contados a partir de la fotografía (BFF) y el número de botones florales reales de la inflorescencia (BFR) en el cv. Tempranillo durante las campañas 2009-2011.

Año	Ecuación	R ²
2009	Nº BFR= 1,81 x Nº BFF - 32,78	0,9482
2010	Nº BFR= 1,74 x Nº BFF - 5,86	0,9807
2011	Nº BFR= 1,99 x Nº BFF + 15,26	0,8617

3.3.4. Tasa de cuajado de baya

En vendimia, se estimó la tasa de cuajado a partir de la relación existente entre el número de flores por racimo y el recuento manual del número de bayas totales de los mismos (Uriarte et al., 2012).

3.3.5. Componentes de la producción

La producción total de uva por cepa se determinó, en el momento de vendimia, mediante el pesado directo en el viñedo de todos los racimos procedentes de 10 cepas marcadas por cada parcela elemental (Balanza 10K32, Cobos precisión, S.L.). Además, se efectuó el recuento de los racimos de cada una de las cepas marcadas y a partir de ambos parámetros, se calculó el peso medio del racimo. El número de bayas totales se estimó dividiendo el peso medio del racimo entre el peso medio de baya.

3.4. Composición y características físico-químicas de la uva

3.4.1. Muestreo de uvas

A partir del envero se tomaron periódicamente muestras de uva hasta la vendimia del último tratamiento, a primeras horas de la mañana. Las muestras consistieron en la recogida de 500 g de uvas en forma de pequeñas porciones de racimos (3-5 bayas) tomados al azar, procedentes de 36 cepas por parcela elemental (2 filas por tratamiento experimental destinadas para el análisis destructivo) de cada uno de los tratamientos, deshojado precoz (ED) y control (C). Las bayas se transportaron en frío al laboratorio de Enología del INTAEX (Instituto Tecnológico y Agroalimentario de Extremadura) perteneciente al CICYTEX.

3.4.2. Determinación de la composición físico-química de las uvas durante la maduración

Una vez en el laboratorio, las bayas fueron separadas del pedicelo y procesadas según el esquema que se muestra en la Figura 3.5.

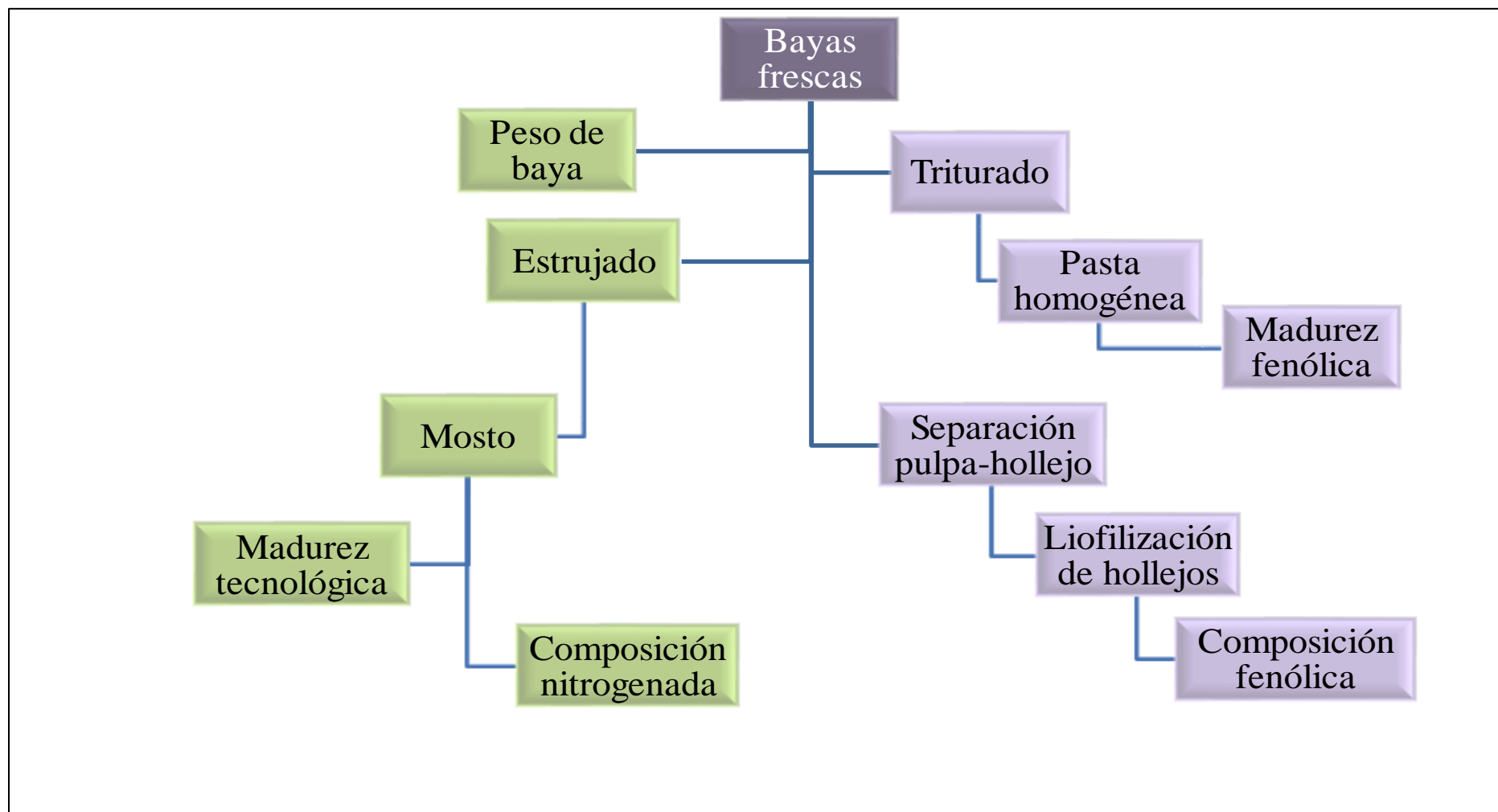


Figura 3.5. Esquema de procesado y análisis realizados para la determinación de la composición de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control y deshojado precoz.

3.4.2.1. Análisis de parámetros indicadores de la madurez tecnológica

Una submuestra de 250 g de uva de cada una de las parcelas elementales se estrujó a una velocidad 3 durante 1 minuto en Thermomix (Modelo TM-31, Worwek, Alemania). A la pasta obtenida se le midió el pH. El mosto separado de la pasta se centrifugó durante 5 minutos a una RCF= 21.952 (Centrífuga Allegra 25R, Beckman Coulter, California, EEUU). El sobrenadante se empleó para el análisis del resto de los parámetros. El contenido en sólidos solubles totales (SST, °Brix) se determinó mediante refractometría (refractómetro digital ATR ST plus Schmidt+Hanzsch, Berlín, Alemania). El pH y la acidez titulable (AT, g ácido tartárico/L) se evaluaron según la metodología oficial de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 1990) en un valorador automático (Crison Micro pH-metro, Barcelona, España). El ácido tartárico (TH₂, g/L) y el ácido málico (MH₂, g/L) se analizaron mediante espectrofotometría, según el método Rebelein (Blouin, 1973) y mediante reacción enzimática respectivamente, en un autoanalizador (Easychem Plus, Systea, Italia). La determinación del potasio (K, g/L) se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica (AA 240 FS, Varian, California, USA) según la metodología oficial (OIV, 1990). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

En vendimia, se congeló una alícuota de 20 mL de mosto a -20 °C procedente de cada parcela elemental hasta el momento del análisis de la composición nitrogenada.

De las muestras recogidas de cada parcela elemental, se tomaron submuestras de 50 bayas (por triplicado) y se pesaron en una balanza (Mettler Toledo PL602-S, Greifensee, Suiza). Una vez pesadas, estas bayas se emplearon para la determinación de los parámetros fenólicos.

3.4.2.2. Análisis de parámetros indicadores de la madurez fenólica

La extracción y determinación de compuestos fenólicos de las uvas se efectuó según la metodología propuesta por Iland et al. (2004). Las uvas se trituraron y homogeneizaron a velocidad máxima durante 3 min. (Omni-mixer homogenizer, Waringbury C.T. USA). A 1 g del homogeneizado obtenido, se añadió 10 mL de una disolución de etanol/agua (50 % v/v) y se maceró durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante en un baño orbital (New Brunswick Shaking Water Bath C76

Gyrotory, Alemania). Transcurrido este período de tiempo, el extracto se centrifugó (RCF= 21.952, 10 min a 4 °C) (Allegra 25R, Beckman Coulter, California, EEUU) y se midió el volumen final obtenido (*extracto final obtenido*, mL). A 0,2 mL de este extracto se le añadió 3,8 mL de una disolución 1 M de ácido clorhídrico (HCl, 37 % PA-ACS-ISO, Panreac, Barcelona, España) y se determinaron las absorbancias (*Abs*) a 280 y 520 nm.

A partir de las absorbancias obtenidas, se calculó la concentración de los fenoles totales y antocianos (mg/L) de los extractos se efectuó a partir de las rectas de calibrado calculadas con ácido gálico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y con cloruro de 3-glucósido de malvidina (Extrasynthese, Francia) (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Rectas de calibración obtenidas para el cálculo de la concentración de fenoles totales, antocianos y taninos.

Parámetro	Recta de calibración	r^2
Fenoles totales	$Abs^{280} (nm) = 0,047 \times \text{Fenoles totales (mg ácido gálico/L)} + 0,02$	0,9994
Antocianos	$Abs^{520} (nm) = 0,059 \times \text{Antocianos (mg de cloruro de malvidina/L)} + 0,01$	0,9995
Taninos	$Abs^{520} (nm) = 0,013 \times \text{Taninos (mg de catequina/L)} + 0,01$	0,9905

Una vez conocido el contenido en fenoles y antocianos de los extractos, se calcularon el PPT (potencial fenólico total) y AnT (antocianos totales) de las uvas en función del peso de la muestra (mg/peso fresco de baya) según las Ecuaciones 4 y 5.

Ecuación 4. Potencial fenólico total (PPT) (mg de ácido gálico/g de peso fresco de baya).

$$PPT = \frac{\left(\frac{Abs\ 280\ nm - 0,02}{0,047} \right) \times \text{Extracto final obtenido (mL)}}{1000 \times \text{Peso de muestra (g)}}$$

Ecuación 5. Contenido antociánico total (AnT) (mg de cloruro de malvidina/g de peso fresco de baya).

$$AnT = \frac{\left(\frac{Abs\ 520\ nm - 0,01}{0,059} \right) \times \text{Extracto final obtenido (mL)}}{1000 \times \text{Peso de muestra (g)}}$$

En el sobrenadante también se determinó el contenido de taninos totales (TnT) (expresado como mg de (+)-catequina/g de peso fresco de baya) según el método propuesto por [Sarneckis \(2006\)](#). A 1 mL de extracto se agregó 3 mL de una disolución de metil celulosa (0,04 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 2 mL de una disolución saturada de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) (Panreac, Barcelona, España) y completando el volumen con agua destilada hasta 10 mL. La mezcla se centrifugó (RCF= 21.952, 10 min a 4 °C) (Allegra 25R, Beckman Coulter, California, EEUU) y en el sobrenadante se midió la absorbancia a 280 nm. Para cada muestra, se determinó también la absorbancia de una muestra control en la que la solución de metilcelulosa se sustituyó por agua destilada. La cuantificación se realizó a partir de la recta de calibrado para (+)-catequina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Tabla 3.7). El cálculo de la concentración de taninos en función del peso fresco de baya se efectuó según la Ecuación 6.

Ecuación 6. Contenido de taninos totales (TnT) (mg de (+)-catequina/g de peso fresco de baya).

$$TnT = \frac{\left(\frac{(Control\ Abs\ 280\ nm - Muestra\ Abs\ 280nm) - 0,01}{0,013} \right) \times Extracto\ final\ obtenido\ (mL)}{1000 \times Peso\ de\ muestra\ (g)}$$

Todas las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro ultravioleta/visible (UV-1700; Shimadzu, Shimadzu Corporation, Kioto, Japón).

3.4.3. Composición nitrogenada de la uva. Determinación de aminoácidos libres y amonio

La composición aminoacídica de la uva se analizó según la metodología puesta a punto por [Valdés et al. \(2011\)](#). Antes de proceder al análisis cromatográfico, tras la descongelación de las muestras, los mostos se desproteinizaron mediante la adición de ácido sulfosalicílico (2,5 % p/v) (PA Panreac, Barcelona, España). Tras 1 h a 4 °C de contacto, se procedió a centrifugar la mezcla a 12.074 RCF, durante 5 min (Microfuga JOUAN A 14, Italia). El sobrenadante se filtró (0,22 µm, Millex-GV; PVDF, Merck-Millipore, Alemania) y se procedió al análisis cromatográfico de la muestra.

La separación y cuantificación del amonio y los aminoácidos se realizó en un autoanalizador de aminoácidos (Biochrom 30, Biochrom Ltd., Cambridge Science Park, Inglaterra) en el que la separación de los compuestos se lleva a cabo mediante una columna de intercambio iónico, usando como eluyentes tampones de citrato de litio de diferentes concentraciones (0,2 M; 0,3 M; 0,5 M; 0,9 M; 1,65 M). La detección y cuantificación de los aminoácidos se efectúa post-columna mediante reacción entre la ninhidrina y el grupo amino del aminoácido en cuestión. El complejo aminoácido-ninhidrina se detecta espectrofotométricamente a 570 nm para todos los aminoácidos excepto para la prolina e hidroxiprolina que se detectan a 440 nm. Cada muestra se analizó por duplicado.

Además del nitrógeno orgánico, también se cuantificó el nitrógeno inorgánico correspondiente al ion amonio (NH_4^+ , AMM) (mgN/L de mosto). Para la cuantificación se realizó una curva de calibrado para cada uno de los compuestos detectados usando los correspondientes patrones (Sigma-Aldrich Ref. A6407/A6282, St. Louis, MO, USA) (Tabla 3.8). Los compuestos nitrogenados se identificaron por su orden de elución y por comparación con los tiempos de retención de los patrones comerciales disponibles.

Tabla 3.8. Aminoácidos y amonio analizados en mostos de uvas del cv. Tempranillo. Longitud de onda, tiempos de retención y patrones empleados para su detección y cuantificación mediante HPLC.

Long. de onda (nm)	Compuesto nitrogenado	Tiempo retención (min)	Patrón o referencia	Recta de calibración y= Área x= Concentración (mmol/L)	R ²
570	Fenilserina (Phser)	4,6	O-Fosfo-L-serina	y = 1E-07x - 0,030	0,9985
	Taurina (Taur)	6,8	Taurina	y = 1E-07x - 0,027	0,9983
	Feniletilamina (Pea)	8,1	O-Fosfoetanolamina	y = 1E-07x - 0,014	0,9991
	Ac. Aspártico (Asp)	20,4	Ácido L-Aspártico	y = 7E-08x - 0,011	0,9997
	Treonina (Thr)	27,0	L-Treonina	y = 1E-07x - 0,005	0,9999
	Serina (Ser)	29,3	L-Serina	y = 1E-07x - 0,006	0,9999
	Asparagina (Asn)	35,9	L-Asparagina	y = 4E-07x + 0,007	0,9997
	Ac. Glutámico (Glu)	33,6	Ácido L-glutámico	y = 1E-07x - 0,002	0,9999
	Sarcosina (Sarc)	42,3	L-Sarcosina	y = 5E-07x + 0,004	0,9965
	Glicina (Gly)	50,0	Glicina	y = 1E-07x - 0,008	0,9996
	Alanina (Ala)	51,7	L-Alanina	y = 1E-07x - 0,004	0,9997
	Citrulina (Citr)	53,5	L-Citrulina	y = 9E-08x - 0,003	0,9997
	Valina (Val)	59,2	L-Valina	y = 1E-07x - 0,006	0,9999
	Cistina (Cys)	63,2	L-Cistina	y = 1E-07x - 0,007	0,9986
	Metionina (Met)	69,3	L-Metionina	y = 1E-07x - 0,004	0,9999
	Isoleucina (Ile)	72,9	L-Isoleucina	y = 1E-07x + 0,0003	0,9999
	Leucina (Leu)	73,9	L-Leucina	y = 1E-07x - 0,008	0,9999
	Tirosina (Tyr)	78,4	L-Tirosina	y = 1E-07x + 0,008	0,9986
	Fenilalanina (Phe)	82,4	L-Fenilalanina	y = 1E-07x - 0,001	0,9998
	Ac. γ-aminobutírico (Gaba)	91,3	Ácido γ-amino-n-butírico	y = 1E-07x - 0,004	0,9996

Tabla 3.8. Continuación.

Long. de onda (nm)	Compuesto nitrogenado	Tiempo retención (min)	Patrón o referencia	Recta de calibración y= Área x= Concentración (mmol/L)	R ²
570	Etanolamina (Ethan)	95,1	Etanolamina	$y = 2E-07x - 0,025$	0,9997
	Amonio (AMM)	98,4	Cloruro de amonio	$y = 9E-08x - 0,027$	0,9997
	Ornitina (Orn)	106,2	L-Ornitina	$y = 1E-07x - 0,012$	0,9999
	Lisina (Lys)	109,4	L-Lisina	$y = 1E-07x - 0,010$	0,9995
	Histidina (His)	113,7	L-Histidina	$y = 1E-07x - 0,006$	0,9995
	Triptófano (Trp)	115,6	L-Triptófano	$y = 1E-07x - 0,010$	0,9997
	Arginina (Arg)	130,8	L-Arginina	$y = 1E-07x - 0,004$	0,9996
440	Hidroxiprolina (Hyp)	23,4	Hidroxil-L-prolina	$y = 4E-07x - 0,001$	0,9969
	Prolina (Pro)	49,6	L-Prolina	$y = 2E-07x + 0,005$	0,9854

A partir de las concentraciones de los aminoácidos individuales y del AMM se calcularon los siguientes índices nitrogenados:

- **Nitrógeno aminoacídico total (*Free Amino Acid Nitrogen, FAN*)** (mgN/L de mosto), determinado a partir del nitrógeno aportado por cada uno de los aminoácidos analizados.
- **Nitrógeno aminoacídico asimilable (*Asimilable Amino Acid Nitrogen, AAA-N*)** según la Ecuación 7:

Ecuación 7. Nitrógeno aminoacídico asimilable (mgN/L de mosto).

$$AAA-N = (FAN - N_{PRO} - N_{HYPRO})$$

N_{PRO} y N_{HYPRO} son las contribuciones de nitrógeno procedentes de prolina e hidroxiprolina respectivamente.

- **Nitrógeno asimilable por las levaduras (*Yeast Asimilable Nitrogen, YAN*)** calculado según la siguiente Ecuación 8:

Ecuación 8. Nitrógeno asimilable por las levaduras (mgN/L de mosto).

$$YAN = AAA-N + AMM$$

- **Precusores aromáticos nitrogenados (*PAN*)** (mgN/L de mosto) determinado a partir del nitrógeno aportado por la suma de los aminoácidos precursores de aromas de fermentación (ácido aspártico, fenilalanina, isoleucina, leucina, tirosina, treonina y valina) ([Valdés et al., 2019](#)).
- **Nitrógeno azufrado total (*Total Sulphur Amino Acid Nitrogen, TAS*)** (mgN/L de mosto) determinado a partir de la suma del nitrógeno aportado por los aminoácidos azufrados (cistina y metionina).

3.4.4. Determinación de la composición polifenólica de los hollejos de las uvas.

Durante las campañas 2009 y 2010, de las muestras recogidas el día de vendimia, se separaron al azar, por triplicado, subgrupos de 50 bayas de cada parcela elemental que se pesaron y almacenaron a -20 °C. Las uvas, aún congeladas, se pelaron con un bisturí y los hollejos se pesaron y liofilizaron hasta la pérdida total de agua (Virtis Génesis 25LL liofilizador; Gardiner, NY). Los hollejos liofilizados de cada subgrupo de 50 bayas se pesaron y trituraron (molinillo 180W, Moulinex. Alençon, Francia).

Los compuestos fenólicos se extrajeron del liofilizado triturado con metanol/ácido fórmico según el siguiente procedimiento puesto a punto en nuestro laboratorio: a 0,5 g del liofilizado se añadieron 4 mL de metanol/fórmico (95:5 v/v) y se mezclaron durante 15 segundos con ayuda de un vórtex (Heidolph Reax Control, Schwabach, Alemania). El extracto obtenido se centrifugó (RCF= 202, 10 min, Centrífuga Orto Alresa Digicen 20, Madrid, España) y el sobrenadante se vertió en un matraz color topacio de 50 mL mantenido a temperatura de refrigeración (4 °C). El proceso de extracción se repitió hasta que el sobrenadante fue incoloro. Los sucesivos sobrenadantes se reunieron en el matraz que se mantuvo en refrigeración durante todo el proceso y finalmente se enrasó a 50 mL con la solución extractante. El proceso se efectuó por triplicado para cada liofilizado obtenido de cada parcela elemental (n = 36 medidas por tratamiento: 4 bloques x 3 muestras x 3 extracciones).

Los extractos, previamente filtrados (Chromafil 0,25 µm de diámetro, Düren, Alemania), se analizaron mediante HPLC. Se empleó un cromatógrafo 1200 LC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipado con un desgasificador, bomba cuaternaria, horno de columna, automuestreador 1290 infinity, detector UV-vis de red de diodos (DAD), detector espectrofotómetro de fluorescencia (FLD), y el paquete de software Chemstation para sistemas LC 3D (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) para controlar el instrumento y para la adquisición y análisis de datos. El análisis se llevó a cabo según la metodología propuesta por [Gómez-Alonso et al. \(2007\)](#) con ligeras modificaciones para mejorar la resolución del método. La separación se llevó a cabo en una columna Ace® 5 C18 250 x 4,6 mm (Advanced Chromatography Technologies, Escocia). Para la identificación y cuantificación de los compuestos se inyectaron 10 µL de extracto directamente en el cromatógrafo. Con el detector DAD se midieron las absorbancias a 320, 360, y 520 nm y con el detector FLD se midió la excitación a 280 y la emisión a 320 nm.

Los compuestos fenólicos se identificaron por su orden de elución y por comparación con los tiempos de retención de los patrones comerciales disponibles: catequina, epicatequina, miricetina, quercetina y trans-resveratrol de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), malvidin-3-glucósido, procianidinas B1 y B2, quercetina, glucósidos de kaempferol e isorhamnetina, miricetina-3-glucósido, y kaempferol-3-rutinósido de Extrasynthese (Genay, Francia), quercetina-3-rutinósido, kaempferol, isorhamnetina, y quercetina-3-galactosido de Fluka (Buchs, Alemania), y ácidos cafeico, cumárico y ferúlico de Merck (Darmstadt, Alemania).

En los extractos se identificaron y cuantificaron los monoglucósidos (3-glu) de delfinidina (Dp), cianidina (Cy), petunidina (Pt), peonidina (Pn), y malvidina (Mv); las formas acetilglucósidas (3-acglu) (DpA, CyA, PtA, PnA, y MvA), y las formas de *p*-cumaroilglucósidas (3-pcmglu) (DpC, CyC, PtC, PnC, y MvC) de esas antocianidinas. Los flavanoles (+)-catequina (CA), (-)-epicatequina (EC) y procianidinas B1, B2, y B3. Los flavonoles miricetina (My), quercetina (Qc), kaempferol (Kp) y isorhamnetina (Ih), sus respectivos 3-glucósidos (MyG, QcG, KpG y IhG), 3-rutinósidos de quercetina (QcR) y kaempferol (KpR), quercetina-3-glucurónido (QcGR) y quercetina-3-galactósido (QcGL); los ácidos fenólicos caftárico, cutárico y fertárico en sus isómeros *cis* y *trans* (cCa - tCa; cCo - tCo; cFt - tFt), ácidos cafeico (CF), cumárico (COU), y ferúlico (Fe) y el estilbeno *t*-resveratrol (tR). La identificación de los compuestos de los que no existía patrón comercial se efectuó en función de su orden de elución y consultando referencias bibliográficas. La cuantificación de estos compuestos se realizó utilizando el compuesto siguiente en el orden de elución perteneciente a la misma familia. En la Tabla 3.9 se muestran los compuestos identificados y cuantificados, las rectas de calibración y el patrón de calibración empleado en cada caso.

Los compuestos fenólicos totales se calcularon a partir de la suma de las concentraciones (mg/kg de peso fresco de baya) de los compuestos individuales, expresados en mg de malvidina-3-glucósido, quercetina-3-glucósido, (+)-catequina, y el ácido cafeico para antocianinas, flavonoles, flavanoles, y ácidos hidroxicinámicos, respectivamente.

Tabla 3.9. Compuestos fenólicos analizados en hollejos de uva del cv. Tempranillo. Longitud de onda, tiempos de retención y patrones utilizados para su detección y cuantificación mediante HPLC.

Long. de onda (nm)	Compuesto fenólico		Tiempo retención (min)	Patrón o referencia	Recta de calibración		R ²
					y= Área	x= Concentración (mg/L)	
520	Antocianos	Monoglucósidos	Cianidina	Cianidina-3-O-Glucósido	y = 36,0x - 4,3		0,9968
			Delfinidina	Malvidina-3-O-Glucósido	y = 30,2x + 1,2		0,9981
			Malvidina	Malvidina-3-O-Glucósido	y = 30,2x + 1,244		0,9981
			Peonidina	Peonidina-3-O-Glucósido	y = 44,4x - 7,5		0,9998
			Petunidina	Malvidina-3-O-Glucósido	y = 30,2x + 1,2		0,9981
	Antocianos	Acetilglucósidos	Cianidina	Cianidina-3-O-Glucósido	y = 36,0x - 4,3		0,9968
			Delfinidina	Malvidina-3-O-Glucósido	y = 30,2x + 1,2		0,9981
			Malvidina	Malvidina-3-O-Glucósido	y = 30,2x + 1,2		0,9981
			Peonidina	Peonidina-3-O-Glucósido	y = 44,4x - 7,5		0,9998
			Petunidina	Malvidina-3-O-Glucósido	y = 30,2x + 1,2		0,9981
	Antocianos	p-cumaril glucósidos	Cianidina	Cianidina-3-O-Glucósido	y = 36,0x - 4,3		0,9968
			Delfinidina	Malvidina-3-O-Glucósido	y = 30,2x + 1,2		0,9981
			Malvidina	Malvidina-3-O-Glucósido	y = 30,2x + 1,2		0,9981
			Peonidina	Peonidina-3-O-Glucósido	y = 44,4x - 7,5		0,9998
			Petunidina	Malvidina-3-O-Glucósido	y = 30,2x + 1,2		0,9981
320 FL	Flavonoles	Monoméricos	(+)- catequina	(+)-Catequina	y = 16,2x + 8,3		0,9995
			(-)-epicatequina	(-)-Epicatequina	y = 12,7x + 17,6		0,9998
		Oligoméricos	Procianidina B1	Procianidina B1	y = 6,9x + 6,0		0,9983
			Procianidina B2	Procianidina B2	y = 7,0x + 7,5		0,9999
			Procianidina B3	Procianidina B1	y = 6,9x + 6,0		0,9983

Tabla 3.9. Continuación.

Long. de onda (nm)	Compuesto fenólico		Tiempo retención (min)	Patrón o referencia	Recta de calibración y=Área x= Concentración (mg/L)	R ²	
360	Flavonoles	Monoglucósidos	Isorhamnetina	35,2	Isorhamnetina-3-O-Glucósido	y = 32,0x + 1,1	0,9721
			Kaempferol	47,8	Kaempferol-3-O-Glucósido	y = 20,1x - 3,4	0,9999
			Miricetina	45,0	Miricetina-3-O-Glucósido	y = 18,9x + 1,4	0,9999
			Quercetina	41,6	Miricetina-3-O-Glucósido	y = 18,9x + 1,4	0,9999
		Rutinósidos	Kaempferol	46,5	Kaempferol-3-O-Rutinósido	y = 15,8x + 0,5	0,9993
			Quercetina	39,8	Miricetina-3-O-Glucósido	y = 18,9x + 1,4	0,9999
		Galactósidos	Quercetina	44,0	Quercetina-3-O-Galactósido	y = 21,3x - 0,3	0,9997
		Glucurónidos	Quercetina	42,0	Miricetina-3-O-Glucósido	y = 18,9x + 1,4	0,9999
		Agliconas	Isorhamnetina	49,0	Isorhamnetina-3-O-Glucósido	y = 31,9x + 1,1	0,9721
			Kaempferol	63,0	Kaempferol-3-O-Glucósido	y = 20,1x - 3,4	0,9999
			Miricetina	70,6	Miricetina-3-O-Glucósido	y = 18,9x + 1,4	0,9999
			Quercetina	71,2	Miricetina-3-O-Glucósido	y = 18,9x + 1,4	0,9999
320	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	Ácido cafeico	26,8	Ácido cafeico	y = 49,5x - 1,7	0,9999
			Ácido cumárico	35,1	Ácido cumárico	y = 62,2x + 2,3	0,9998
			Ácido Ferúlico	38,3	Ácido Ferúlico	y = 38,1x + 2,4	0,9956
		Derivados del ácido hidroxicinamil-tartárico	Ácido <i>c</i> -caftárico	18,4	Ácido cafeico	y = 49,5x - 1,7	0,9999
			Ácido <i>t</i> -caftárico	20,7	Ácido cafeico	y = 49,5x - 1,7	0,9999
			Ácido <i>c</i> -cutárico	24,6	Ácido cumárico	y = 62,2x + 2,3	0,9998
			Ácido <i>t</i> -cutárico	27,3	Ácido cumárico	y = 62,2x + 2,3	0,9998
			Ácido <i>c</i> -fertárico	28,4	Ácido Ferúlico	y = 38,1x + 2,4	0,9956
			Ácido <i>t</i> -fertárico	30,2	Ácido Ferúlico	y = 38,1x + 2,4	0,9956
320	Estilbenos	<i>t</i> -resveratrol	56,4	<i>t</i> -resveratrol	y = 75,2x - 11,8	0,9999	

3.5. Vinificaciones experimentales

La vendimia se realizó de forma manual. En todos los años de estudio, las uvas del tratamiento de deshojado precoz y del tratamiento control se vendimiaron con similar contenido en SST (23-24 °Brix). En la Tabla 3.4 se muestran las fechas de vendimia en los tres años de estudio.

Las uvas se transportaron a la bodega experimental del INTAEX y se efectuó una microvinificación por cada parcela elemental según el proceso que se muestra en la Figura 3.6. La vendimia (60 kg por cada parcela elemental) fue despallada y estrujada mecánicamente (Estrujadora-Depalladora Modelo Micra/15, Agrovín, España) y la pasta se encubó en depósitos de acero inoxidable de 50 L de capacidad situados en cámaras termostatzadas. A cada depósito se añadieron sulfitos (70 mg/kg de SO₂ en forma de K₂S₂O₅), el ácido tartárico correspondiente para llevar el pH a 3,5 y 25 g/hL de levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*, Viniferm CR de Agrovín). La maceración-fermentación se llevó a cabo a 22-26 °C. Durante el proceso de maceración-fermentación se sumergió el sombrero dos veces al día, mediante la adición de N₂ con un dosificador automático (Delta TPO2, Delta AC Drives, EEUU).

Diariamente se controló la temperatura (sonda Hanna instruments, Woonsocket, Rhode Island, Estados Unidos), la densidad, (balanza hidrostática Super Alcomat, Gibertini, Italia) y el índice de polifenoles totales (IPT), mediante medida de la absorbancia a 280 nm, tras la dilución apropiada de una muestra de la fracción líquida de cada depósito (espectrofotómetro ultravioleta/visible UV-1700; Shimadzu, Shimadzu Corporation, Kioto, Japón).

El descubado, que se realizó cuando el valor del IPT se estabilizó, se efectuó por gravedad. Se recogió únicamente la fracción mosto-yema, que continuó la fermentación alcohólica en depósitos de vidrio de 16 L. Una vez comprobado que la fermentación alcohólica había finalizado (azúcar residual < 4 g/L), los vinos se trasegaron, se repuso el SO₂ total hasta 75 mg/L y se almacenaron a 1 °C durante 2 meses. Finalmente, los vinos se embotellaron (botellas de 0,75 L) y almacenaron a 15 °C hasta su análisis, que fue realizado tres meses después del embotellado. En ningún caso se llevó a cabo la fermentación maloláctica.

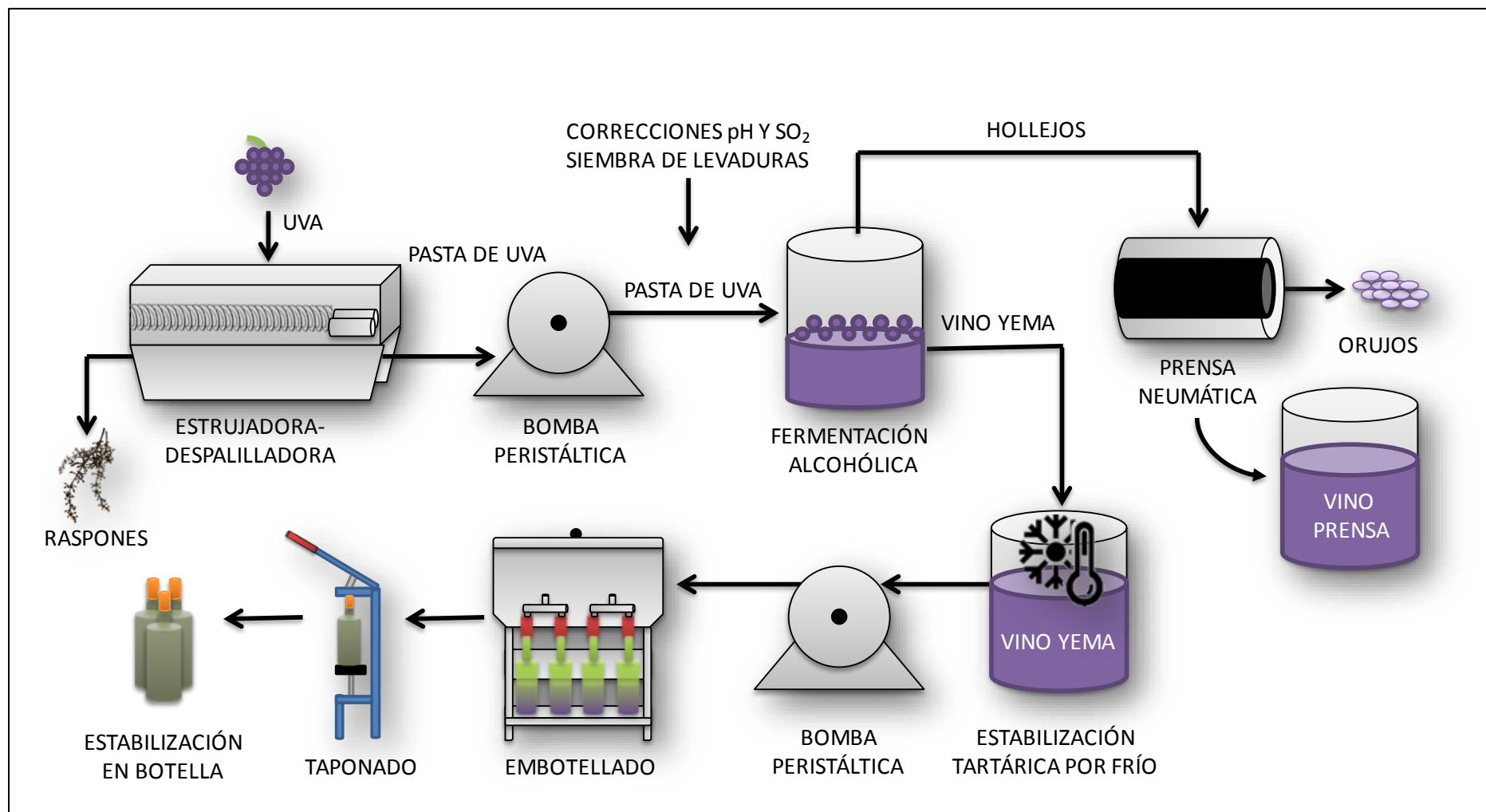


Figura 3.6. Esquema de microvinificación.

3.6. Análisis de los mostos y vinos

3.6.1. Parámetros enológicos generales

En los mostos de partida de las diferentes microvinificaciones experimentales, a demás de la densidad, se analizaron el pH, acidez total (AT), ácido tartárico (TH₂), ácido málico (MH₂) y potasio (K) según las mismas metodologías empleadas en la uva (epígrafe 3.4.2).

El grado alcohólico de los vinos (% v/v) se determinó mediante medida de la densidad del destilado (balanza hidrostática Super Alcomat, Gibertini, Italia), según los métodos propuestos por la [OIV \(1990\)](#). El análisis de la acidez volátil se realizó mediante la valoración ácido-base de los ácidos volátiles separados por arrastre de vapor de agua y rectificación de vapores (Gibertini, Italia). La determinación de SO₂ libre y total se efectuó mediante valoración redox en un valorador automático (Crison TritroMatic 2S-3B, Barcelona, España). Los azúcares residuales (g/L) se cuantificaron mediante valoración espectrofotométrica ([Nelson, 1944](#)) en los vinos previamente defecados con carbón activo. Para ello se añadieron 0,4 g a 5 mL de muestra y después se centrifugó (RFC= 12.074, 5 min) (Microfuga JOUAN A14, Italia). Para cada parámetro, todos los análisis fueron realizados por triplicado.

3.6.2. Composición fenólica y características cromáticas de los vinos

La concentración de fenoles totales (mg de ácido gálico/L), antocianos (mg de glucósido de malvidina/L) y taninos (mg de (+)-catequina/L) de los vinos se determinaron siguiendo la misma metodología que la utilizada para el análisis de los extractos de uva.

La contribución de la copigmentación al color total del vino a pH 3,6 (% de antocianos copigmentados, % AC) se determinó según el método propuesto por [Boulton \(1996\)](#). Tras ajustar el pH de la muestra de vino a pH 3,6 se realizaron las siguientes determinaciones:

- **Color total del vino (A^{acet}):** tras la adición de 20 μL de acetaldehído al 10 % a 2 mL de muestra de vino y mantenido durante 45 minutos, se realizó la medida de la absorbancia a 520 nm (utilizando agua como blanco) en un espectrofotómetro ultravioleta/visible.

- **Color del vino sin el efecto de antocianos copigmentados (A^{20}):** Se calculó mediante la medida de la absorbancia a 520 nm de la muestra de vino previamente diluida (1:20) con una disolución tamponada de pH 3,6 (24 ml de etanol puro se añaden a 176 ml de agua destilada y se disuelven en la solución 0,5 g de bitartrato potásico, cuyo pH es ajustado a 3,6 con HCl o NaOH según sea necesario).
- **Antocianos copigmentados (%):** se calculó según la siguiente ecuación:

Ecuación 9. Antocianos copigmentados (AC, %).

$$AC = \frac{(A_{acet} - A_{20})}{A_{acet}} \times 100$$

Las características cromáticas de los vinos se han determinado mediante una serie de parámetros basados en la medida de las absorbancias a diferentes longitudes de onda (420, 520 y 620 nm) siguiendo el método de [Glories \(1999b\)](#):

- Absorbancia a 420 nm (A_{420}).
- Absorbancia a 520 nm (A_{520}).
- Absorbancia a 620 nm (A_{620}).
- Intensidad del color (IC) = $A_{420} + A_{520} + A_{620}$.
- Tonalidad de color (TC) = A_{420}/A_{520} .
- % Amarillo = $A_{420}/(A_{420} + A_{520} + A_{620})$
- % Rojo = $A_{520}/(A_{420} + A_{520} + A_{620})$
- % Azul = $A_{620}/(A_{420} + A_{520} + A_{620})$

Las muestras de vino fueron filtradas (Chromafil 0,25 μ m de diámetro, Düren, Alemania) antes de realizar las medidas espectrofotométricas.

Todas las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro UV visible (Shimadzu UV-1700; Shimadzu Corporation, Kioto, Japón).

3.6.3. Composición aromática del vino

La identificación y cuantificación de los compuestos volátiles del vino se realizó según el método desarrollado por [Oliveira et al. \(2006\)](#) con ligeras modificaciones ([Vilanova et al., 2010](#)). En un tubo de vidrio de 10 mL (Pyrex, ref. 1636 / 26MP), se añadieron 8 ml de vino, 2,4 μ g de patrón interno (4-nonanol, Merck ref. 818 773, Darmstadt, Alemania)

y una barra de agitación magnética (22,2 mm x 4,8 mm). La extracción de los compuestos volátiles se realizó mediante la agitación de la muestra con 400 μ L de diclorometano (Merck, ref. 1.06054; Darmstadt, Alemania) durante 15 minutos. Después de enfriar la mezcla a 0 °C durante 10 min, se retiró la barra de agitación magnética y se separó la fase orgánica por centrifugación (RCF = 5118, 5 min, 4 °C) y se recuperó el extracto en un vial usando una pipeta Pasteur. El extracto aromático (200 μ g/L aprox.) se secó con sulfato de sodio anhidro (Merck, ref. 1.06649; Darmstadt, Alemania) y se trasvasó a un nuevo vial. La extracción de los compuestos volátiles de cada uno de los respectivos vinos se realizó por triplicado.

El análisis cromatográfico de los compuestos volátiles se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N acoplado un espectrómetro de masas ion-trampa Agilent 55975C. Se empleó una columna capilar CP-Wax 52 CB (50 m x 0,25 mm i.d, 0,2 μ m espesor, Chrompack). Se inyectó 1 μ L de extracto en modo splitless (15 s). La temperatura del inyector (7683) se programó desde 20 °C hasta en 250 °C a 180 °C/min. La temperatura del horno se mantuvo a 40 °C durante 5 minutos, a razón de 3 °C por min. Posteriormente se programó un incremento desde 20 °C a 250 °C y, finalmente, programado desde 250 °C a 255 °C, a 1 °C/min. El gas portador fue helio N60 (Air Liquide) a 103 kPa lo que se corresponde con 180 cm/s a 10 °C y la ventana del split fue programada a 3 ml/min. El detector se configuró en modo de impacto electrónico (70 eV) con un rango de adquisición desde 2 a 360 m/z, y un ratio de 610 ms.

La identificación de los compuestos volátiles se realizó usando el software gratuito Wsearch32 mediante la comparación con los espectros de masas (librerías Wiley y Nist) y tiempos de retención con los patrones puros y confirmándolos mediante GC-MS. Todos estos compuestos fueron cuantificados como equivalentes de 4-nonanol. Los compuestos identificados y cuantificados se muestran en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Compuestos volátiles identificados y cuantificados en los vinos del cv. Tempranillo.

Compuesto volátil	Familia	Tiempo retención (min)
1-Propanol	Alcohol	9,3
Butirato de etilo	Ester	9,5
2-Metil-1-pentanol	Alcohol	10,9
Acetato de isoamilo	Acetato	12,1
1-butanol	Alcohol	12,7
2+3-Metil-1-butanol	Alcohol	15,4
Hexanoato de etilo	Ester	16,3
Acetoína	C. Carbonilo	17,9
4-Metil-1-pentanol	Alcohol	19,6
3-Metil-1-pentanol	Alcohol	20,1
Lactato de etilo	Ester	20,9
1-Hexanol	Alcohol C ₆	21,2
E-3-hexenol	Alcohol C ₆	21,6
Z-3-Hexanol	Alcohol C ₆	21,7
E-2-Hexanol	Alcohol C ₆	22,3
Z-2-Hexanol	Alcohol C ₆	22,6
Octanoato de etilo	Ester	24,7
1-Octen-3-ol	Alcohol	25,4
1-Heptanol	Alcohol	25,5
3,3-Butanodiol	Alcohol	29,2
Ácido Isobutírico	Ácido	31,1
Butirolactona	Lactona	33,1
Ácido butírico	Ácido	33,4
Succinato de etilo	Ester	34,5
Ácido 2-metil-butanoico	Ácido	34,9
Metionol	Alcohol	36,1
2 feniletilacetato	Acetato	39,8
Ácido hexanoico	Ácido	41,3
Alcohol bencílico	Alcohol	42,0
2-feniletanol	Alcohol	43,3
Malato de dietilo	Ester	47,5
Ácido octanoico	Ácido	48,5
Ácido hexadecanoico	Ácido	70,4

3.6.4. Valor de la actividad odorífera

Para evaluar la contribución de cada uno de los compuestos volátiles al aroma del vino se determinó el valor de actividad odorífera (VAO). El VAO se calcula como el cociente entre la concentración del compuesto individual y su umbral de percepción. Se considera que un compuesto contribuye al aroma de un vino cuando este cociente es > 1 . Los umbrales de percepción utilizados en este estudio para calcular los VAO de cada compuesto fueron los encontrados en la bibliografía (Etiévant, 1991; Ferreira et al, 2000; Francis y Newton, 2005; Vilanova et al., 2009).

3.6.5. Análisis organoléptico del vino

La evaluación sensorial de los vinos del cv. Tempranillo se llevó a cabo durante los años 2010 y 2011, tras un periodo de 3 meses de permanencia en botella, con el fin de determinar la influencia del tratamiento de deshojado precoz sobre las características organolépticas de los mismos.

Las sesiones de análisis sensorial se realizaron por un panel de cata formado por 9 jueces expertos en la sala de catas del INTAEX (CICYTEX). A los catadores se les sirvió un volumen constante de 25 mL en catavinos normalizados (ISO 3591, 1997).

Se realizó un análisis descriptivo cuantitativo en fase visual, olfativa y gustativa. Los atributos a valorar en cada fase del análisis sensorial fueron previamente definidos por nuestro grupo de investigación para los vinos de la variedad Tempranillo (Gamero et al., 2014). En dicho trabajo los descriptores se generaron de acuerdo a la metodología QDA (Lawless y Heymann, 1998) según la cual los descriptores se seleccionan en función del valor de su media geométrica (GM, %), que tiene en cuenta la frecuencia e intensidad con la que fue percibido cada uno de los atributos (ISO 11035, 1994). Se estableció como criterio de selección de descriptores, aquellos que presentaron una $GM > 10\%$ de acuerdo con Vilanova et al. (2012d).

La Figura 3.7 muestra la ficha de cata empleada. Cada descriptor se evaluó mediante una escala estructurada en 10 niveles de intensidad, donde 0 correspondía con la ausencia de percepción y 10 con máxima intensidad del descriptor.

Se evaluaron un total de 16 vinos (4 bloques x 2 tratamientos experimentales por 2 repeticiones) repartidos en dos sesiones de cata.

Fecha:												
Catador:												
FASE VISUAL												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Color cereza	No perceptible	-----										Muy intenso
Color violáceo	No perceptible	-----										Muy intenso
Intensidad de color	No perceptible	-----										Muy intenso
FASE OLFATIVA												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Floral	No perceptible	-----										Muy intenso
Herbáceo	No perceptible	-----										Muy intenso
Frutos rojos	No perceptible	-----										Muy intenso
Regaliz	No perceptible	-----										Muy intenso
Persistencia	No perceptible	-----										Muy intenso
FASE GUSTATIVA												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Acidez	No perceptible	-----										Muy intenso
Estructura	No perceptible	-----										Muy intenso
Tánico	No perceptible	-----										Muy intenso
Amargor	No perceptible	-----										Muy intenso
Alcohólico	No perceptible	-----										Muy intenso
Equilibrio	No perceptible	-----										Muy intenso
Persistencia	No perceptible	-----										Muy intenso

Figura 3.7. Ficha utilizada en el análisis sensorial de los vinos del cv. Tempranillo.

3.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los parámetros agronómicos, uva, mosto y vino se sometieron a análisis estadísticos con el objetivo de estudiar el efecto de cada uno de los factores estudiados (deshojado precoz y año) y la posible interacción entre ellos. Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (tratamiento y año) y su interacción (Tr x Año). La comparación de medias se calculó mediante el test “t” de Student, con un intervalo de confianza del 95 % ($p < 0,05$). Se efectuó un análisis de componentes principales (ACP) con el objetivo de determinar la varianza explicada por las variables y así analizar la influencia de los tratamientos y el año. El análisis de regresión lineal se empleó para analizar las relaciones entre los valores de la concentración de los aminoácidos e índices nitrogenados y los de los parámetros agronómicos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el software informático XLstat-Pro (Addinsoft, París 2011).

4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto del deshojado precoz sobre el desarrollo vegetativo y productivo de la cepa y las características de la uva

4.1.1. Condiciones meteorológicas de los años 2009-2011

Las condiciones climáticas ejercen una fuerte influencia sobre la velocidad de síntesis y acumulación de los distintos componentes de la uva durante su desarrollo y condicionan su composición en el momento de la vendimia (Winkler, 1965; Van Leeuwen et al., 2004; Seguin y García de Cortázar, 2005; Webb et al., 2008). Por eso, para evaluar el efecto del deshojado precoz sobre los aspectos agronómicos, la maduración de la uva y su composición en el momento de la cosecha y la del vino a partir de ellas elaborados, el presente estudio se ha desarrollado durante tres campañas consecutivas.

A pesar de que tanto las temperaturas medias del periodo vegetativo-productivo (V-P, abril-septiembre) (21,2 °C en 2009 y 21,6 °C en 2010 y 2011) como las medias anuales (enero-diciembre) (16,6, 16,3 y 16,4 °C en 2009 2010 y 2011 respectivamente) fueron similares en los tres años del estudio al realizar un análisis más detallado y profundo de las condiciones climatológicas de esos años se observan ciertas diferencias interanuales (Tabla 3.2, epígrafe 3.1.2).

En 2009 y 2011, las temperaturas máximas registradas en los meses de mayo y junio fueron superiores a las de la media del periodo 2004-2011 y en los meses de julio y agosto fueron las habituales.

En 2010, los valores de las temperaturas máximas de los meses de mayo y junio fueron inferiores a los del 2009 y 2011 e incluso menores que las de la media del periodo 2004-2011. Sin embargo, en julio y agosto se registraron temperaturas máximas superiores a las medias del mismo periodo.

Las temperaturas medias durante el periodo de maduración de la uva (julio-septiembre) fueron superiores a los 16 °C, lo que indica que el viñedo de estudio se localiza en una “zona Beta” de producción, según la clasificación de Jackson y Lombard (1993). Las zonas Beta son aquellas en las que la mayoría de los cultivares maduran mucho antes de que las temperaturas descendan por debajo de los 10 °C. Así, los días y

las noches siguen siendo cálidos, y alcanzar la madurez no supone, en principio, un problema.

En lo que respecta a las precipitaciones, los valores registrados durante el periodo V-P en los años 2010 y 2011 se encontraron dentro de la media registrada en la zona (150 mm; media 2004-2011). Sin embargo en el año 2009 apenas se sobrepasó los 100 mm, año en el cual, el 39 % de la precipitación se registró durante el mes de diciembre (Fig. 3.1, epígrafe 3.1.2), y que, probablemente, dio lugar a una elevada disponibilidad hídrica en el suelo en el inicio del ciclo vegetativo de la campaña siguiente. En el año 2010, aunque se registró el verano de menor precipitación, en comparación con los otros dos estudiados, la precipitación anual fue de 200 mm, superior a la media de los últimos 8 años, con el 58% de la precipitación registrada durante el invierno y la primavera y el 39 % durante el otoño. De nuevo, las lluvias registradas en otoño posiblemente aumentaron la disponibilidad hídrica del suelo durante la siguiente campaña. El 2011 fue el año en el que se registró un menor volumen de precipitación anual, 400,4 mm, valor inferior a la media registrada durante los años 2004-2011. El reparto de dichas precipitaciones fue del 59 % durante las estaciones de invierno y primavera, un 7 % durante los meses de verano y el resto (34 %) durante el otoño.

La Tabla 4.1 muestra los valores de los índices bioclimáticos (índice heliotérmico, HI; índice de frescor nocturno, CI; índice de sequía, DI) que definen el clima vitícola de la zona según **Tonietto y Carbonneau (2004)**. Estos valores clasifican la zona del ensayo como región de clima cálido, noches templadas y muy seco. Al analizar los valores de manera detallada, y como consecuencia de las temperaturas y lluvias de los diferentes años, se observó que durante la campaña 2009 se registraron los menores valores de HI (2764) y los valores más negativos de DI (-197,7) respecto de las dos campañas siguientes (HI, 2836 y 2846; DI, -178 y -162,2 en 2010 y 2011 respectivamente).

Debido a que las cepas de ambos tratamientos se regaron con el 100 % de la ET_c, la disponibilidad de agua durante el periodo de riego no debe haber sido un factor limitante para el desarrollo del cultivo en ninguno de los años de estudio (Tabla 3.4, epígrafe 3.2)., El potencial hídrico de tallo (ψ_t) (2009-2011), medido a medio día solar, que determina el estado hídrico de las cepas, fue de -0,55 MPa (valor medio obtenido de brotación-cosecha) en el caso del tratamiento C y -0,54 MPa (valor medio brotación-cosecha) en el de ED, sin descender, durante ninguno de los años y tratamientos, por debajo de -1,0

MPa, valor que, según diferentes autores, es indicativo de ausencia de estrés hídrico en el viñedo (Tregoat et al., 2002; Williams y Araujo, 2002; Leeuwen et al., 2007).

Tabla 4.1. Índices bioclimáticos correspondientes a los años 2009, 2010 y 2011 en la zona del viñedo experimental del cv. Tempranillo.

Índice	2009		2010		2011		2009-2011	
	Valor	Clima vitícola	Valor	Clima vitícola	Valor	Clima vitícola	Valor	Clima vitícola
HI: Heliotérmico	2764	Cálido (HI+2)	2836	Cálido (HI+2)	2846	Cálido (HI+2)	2815	Cálido (HI+2)
CI: Frescor nocturno (°C)	16,6	Noches templadas (CI-1)	17,2	Noches templadas (CI-1)	16,2	Noches templadas (CI-1)	16,7	Noches templadas (CI-1)
DI: Sequía (mm)	-197,7	Muy seco (DI+2)	-178,2	Muy seco (DI+2)	-162,2	Muy seco (DI+2)	- 179,4	Muy seco (DI+2)

4.1.2. Desarrollo vegetativo y componentes de la producción.

La Tabla 4.2 muestra el efecto del deshojado precoz sobre desarrollo vegetativo de las cepas en los tres años de estudio. El área foliar eliminada (AFE), varió entre el 36 del área foliar desarrollada en el momento del deshojado (AFT_i) en 2009 y el 50% 2010. Esta diferencia se explica principalmente en base a la diferente intensidad con que se efectuó el deshojado, ya que en 2009 se eliminaron las hojas de los siete primeros nudos del pámpano principal, y en las dos campañas siguientes se eliminaron éstas y también las hojas de los brotes anticipados. Debido a los elevados valores de AFT_i en 2011, los mayores de las tres campañas, aunque la intensidad del deshojado fue similar a la del año anterior, el AFE sólo alcanzó el 40% del AFT_i .

Tabla 4.2. Área foliar existente en el momento en el que se efectuó el deshojado (AFTi), área foliar eliminada (AFE) y área foliar total media en el periodo de envero a vendimia (AFTm) de las cepas del tratamiento (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) del cv. Tempranillo (campañas 2009-2011).

Parámetro	2009		2010		2011		2009-2011		Significación		
	C	ED	C	ED	C	ED	C	ED	Tr	Año	Tr x Año
AFTi (m ² /cepa)	3,1		3,8		5,3		4,1		-	-	-
AFE (%)	0	36	0	50	0	40	0	42	-	-	-
AFTm (m ² /cepa)	9,1	7,2**	7,1	6,7	11,1	8,7*	9,1	7,5	*	***	*

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento x año); *, ** y *** indican significación a $p<0,05$, $p<0,01$ y $p<0,001$ respectivamente.

Tras la aplicación del deshojado precoz, al igual que en las cepas C, el área foliar de las ED continuó aumentando hasta la parada de crecimiento próxima al envero, momento en el que queda fijado el área foliar máxima de la campaña en cuestión. El deshojado precoz provocó descensos significativos del valor del área foliar total media (AFTm) respecto al tratamiento control en las campañas 2009 y 2011. Sin embargo, hay que destacar que la amplitud de estos descensos fueron menores que las correspondientes AFE. Este resultado implica una cierta recuperación del área foliar en los tratamientos ED debida, posiblemente, a una estimulación en el crecimiento de los brotes anticipados. [Poni et al. \(2009\)](#) observaron resultados similares en las cepas del cv. Barbera cultivadas en Piacenza (Italia). En el año 2010 la recuperación foliar de ED llegó a igualar el AFTm de ambos tratamientos.

La Tabla 4.3 muestras el efecto del deshojado precoz sobre el número de flores/racimo (inflorescencia) y la tasa de cuajado. En la primera campaña de aplicación del deshojado (2009), esta técnica no modificó ninguno de estos dos parámetros. Estos resultados pueden ser explicados, por una parte, a la menor intensidad con que se efectuó la práctica, como así lo describe [Acimovic et al. \(2016\)](#), y por otro, a la capacidad de la vid para amortiguar el fuerte estrés causado por el deshojado, bien a través de la movilización de reservas de estructuras permanentes, o a través de la compensación fotosintética de las hojas restantes ([Pallioti et al., 2010](#)).

Tabla 4.3. Número de flores por racimo y tasa de cuajado (%) determinados en las cepas de los tratamientos (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) del cv. Tempranillo (campañas 2009-2011)

Parámetro	2009		2010		2011		2009-2011		Significación		
	C	ED	C	ED	C	ED	C	ED	Tr	Año	Tr x Año
Nº flores/racimo	349	341	565	560	712	599*	452	500	ns	***	*
Tasa de cuajado (%)	60	52	52	33*	42	35	51	40	**	**	ns

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento \times año); *, **, *** y ns: indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$ $p < 0,001$ y no significativo respectivamente.

El deshojado precoz provocó descensos significativos ($p < 0,05$) del número de flores/racimo en 2011 y en la tasa de cuajado en el 2010, campaña en la que, además de ser significativas, las diferencias de la tasa de cuajado (%) fueron las de mayor amplitud (33 % en ED frente al 52 % de C). Este hecho puede explicarse en base a la mayor intensidad con que se efectuó el deshojado ese año (Tabla 4.2). Estos resultados son similares a los hallados por [Basile et al. \(2015\)](#) y [Acimovic et al. \(2016\)](#) al aplicar esta técnica en otras variedades y zonas (cv. Aglianico en Salerno, Italia y cv. Pinot Noir en Michigan, EEUU respectivamente). La tasa de cuajado es una función directa del número de hojas de los brotes principales durante la etapa de pre-floración, parámetro que depende del aporte de hidratos de carbono ([Coombe, 1962](#); [Caspari y Lang, 1996](#); [Poni et al., 2005](#)) y de la tasa fotosintética durante el período de floración ([Keller y Klobet 1994](#); [Ferrée et al., 2001](#)) lo que explica que una limitación en la disponibilidad de carbohidratos reduzca las tasas de cuajado. La disminución de la tasa de cuajado como consecuencia del deshojado precoz ha sido observada por diferentes investigadores en otras variedades y zonas como Sangiovese, Barbera, y Lambrusco en Italia ([Poni et al., 2006](#); [Intrieri et al., 2008](#); [Poni et al., 2009](#)), Tempranillo, Graciano y Mazuelo en la Rioja, España ([Diago, 2010](#)) o Albariño en Pontevedra, España ([Otero, 2015](#)).

La Tabla 4.4 muestra el efecto del deshojado precoz sobre los componentes de la producción, y sobre el ratio área foliar total media/producción (AFT_m/P) en las cepas del cv. Tempranillo en las campañas 2009-2011. Los resultados indican que, en la mayoría de los parámetros evaluados, el efecto dependió del año, como lo demuestra la existencia de interacciones significativas tratamiento \times año (Tr \times Año). En el año 2009, el deshojado precoz (ED) no causó ninguna variación sobre estos parámetros. En 2010 provocó un incremento ($p < 0,01$) del nº de racimos/cepa y en 2011 un descenso ($p < 0,01$) respecto de los valores de las cepas control (C).

Tabla 4.4. Componentes de la producción y ratio área foliar total media/producción (AFTm/P) en cepas del cv. Tempranillo (campañas 2009-2011) a partir del tratamiento (Tr) control (C) y de deshojado precoz (ED).

Parámetro	2009		2010		2011		2009-2011		Significación		
	C	ED	C	ED	C	ED	C	ED	Tr	Año	Tr x Año
Nº racimos/cepa	20,5	20,0	19,8	22,1**	22,3	19,8**	20,9	20,6	ns	ns	***
Nº bayas/racimo	127	161	216	125**	220	131	188	139	**	ns	**
Peso de racimo (g)	248,0	299,2	381,2	207,5**	264,7	225,8**	298,0	244,2	***	ns	***
Producción (t/ha)	16,8	19,7	20,4	15,0*	19,5	15,1***	18,9	16,6	**	ns	*
AFT _m /P (m ² /Kg)	1,8	1,2*	1,2	1,5	1,9	1,9	1,6	1,5	ns	***	ns

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento × año); *, **, *** y ns: indican significación a $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ y no significativo respectivamente.

Estudios realizados por diferentes investigadores confirman que el deshojado precoz es una herramienta eficaz para reducir la compacidad y conseguir controlar la carga de cultivo en variedades caracterizadas por su gran tamaño de racimo (Poni et al., 2006; Poni et al., 2008; Intrieri et al., 2008; Lohitnavy et al., 2010; Sabbatini y Howell, 2010; Tardaguila et al., 2010; Tardaguila et al., 2012). En el presente estudio, el deshojado precoz tendió a reducir la tasa de cuajado en los tres años evaluados, siendo esta reducción significativa en el año 2010 y como consecuencia se observó, en el tratamiento ED una tendencia a la disminución del número de bayas por racimo, de manera significativa ($p<0,01$) en el año 2010 y, con excepción del 2009, a la disminución del peso de racimo y la producción en comparación con el tratamiento C. Por lo tanto, y en total concordancia con otros estudios ya citados (Poni et al., 2006; Intrieri et al., 2008; Poni et al., 2009), la reducción de la tasa de cuajado, que provocó la disminución del número de bayas/racimo y del peso del racimo, originó el consiguiente descenso significativo de la producción en los años 2010 y 2011 en el tratamiento ED en comparación con el C.

Los resultados observados durante la campaña 2009 pueden ser una consecuencia directa de los ataques de *Botrytis cinerea* al que se vio afectado el viñedo durante dicha campaña. La incidencia de esta enfermedad fue mayor en el tratamiento C con un claro descenso en la producción. El ataque fue menos severo en el caso de ED, ya que la eliminación de parte de la vegetación favoreció la aireación de los racimos y la efectividad de los tratamientos fungicidas. Estudios desarrollados en los cv Tempranillo en La Rioja (Norte de España) (Diago et al., 2010) y Pinot Noir en Michigan (EEUU) (Sabbatini y

Howell, 2010) mostraron que la incidencia de *Botrytis cinerea* se reducía significativamente cuando se aplicaba el deshojado precoz, debido principalmente a la reducción del número de bayas por racimo como consecuencia de la menor tasa de cuajado, dando lugar a una menor compacidad de los racimos y mejorando la circulación del aire y exposición lumínica.

Además de la mayor intensidad con que se efectuó el deshojado precoz en 2010 y 2011, para explicar el mayor efecto del tratamiento, hay que considerar también la repercusión de la aplicación de dicha técnica en campañas sucesivas. Estudios previos sobre el efecto acumulativo del deshojado tradicional (**May et al., 1969; Bennett et al., 2005**) indicaron que los mecanismos involucrados en la relación entre el deshojado, la disponibilidad y reserva de carbohidratos y los componentes florales podrían considerarse por el efecto directo causado durante el año de aplicación del deshojado y por efecto *arrastrado* en campañas posteriores al deshojado, incidiendo sobre la fertilidad de las yemas. Este efecto se ha observado también en cepas en las que se ha practicado el deshojado precoz como han mostrado los estudios de **Diago (2010)** y **Risco et al. (2014)**, efectuados en el cv. Tempranillo en las zonas de Rioja y Requena (Valencia) respectivamente. Sin embargo, otros investigadores no han observado efecto del deshojado precoz sobre el número de racimos en campañas posteriores a la aplicación del tratamiento (**Sabbatini y Howell, 2010; Acimovic et al., 2016**).

El ratio AFT_m/P es un índice comúnmente empleado para expresar el balance entre la capacidad fuente de las cepas y la demanda de fotoasimilados por parte de los racimos (**Kliewer y Dokoozlian, 2005**). A este respecto hay que destacar que, aunque el deshojado precoz provocó reducciones significativas del área foliar total media (AFT_m) respecto de las C en las campañas 2009 ($p < 0,01$) y 2011 ($p < 0,05$), el ratio AFT_m/P solo se modificó significativamente ($p < 0,05$) en 2009 disminuyendo su valor en ED vs C (Tabla 4.4). Este resultado se explica en base a los ataques de *Botrytis cinerea*, anteriormente mencionados, que provocaron descensos en la producción, con el consiguiente aumento de los valores de ese ratio.

4.1.2.1. Análisis de componentes principales (ACP) de los componentes de la producción

Con el objetivo de representar gráficamente los resultados de los tres años de estudio, los valores medios de los parámetros relacionados con los componentes del rendimiento, el número de flores por racimo y la tasa de cuajado determinados en las cepas control (C), y en cepas sometidas al tratamiento de deshojado precoz (ED) se realizó un análisis de componentes principales (ACP) (Figura 4.1).

Los dos primeros componentes principales (CP) explican el 79,4 % de la varianza total, correspondiendo un 49,6 % al CP1 y un 29,8 % al CP2 (Fig. 4.1). El eje CP1 se caracteriza fundamentalmente por la producción, peso de racimo y tasa de cuajado en su parte positiva y por el nº racimos/cepa y AFT_m/P en su parte negativa. Por otra parte, todos los parámetros, a excepción de la tasa de cuajado, caracterizan la parte positiva del eje CP2. La tasa de cuajado caracterizó la parte negativa de ese mismo eje (CP2).

El año 2009 estuvo determinado por una alta tasa de cuajado, independientemente del tratamiento. Sin embargo, sí se observaron diferencias entre tratamientos en los años 2010 y 2011. El deshojado precoz en 2010 dio lugar a un mayor ratio área foliar total media/producción (AFT_m/P) frente al control que destacó por una mayor producción y peso de racimo. De la misma, forma el control en el año 2011 también mostró diferencias con el deshojado precoz, distinguiéndose fundamentalmente por un elevado número de flores/racimo, racimos/cepa y número de bayas/racimo.

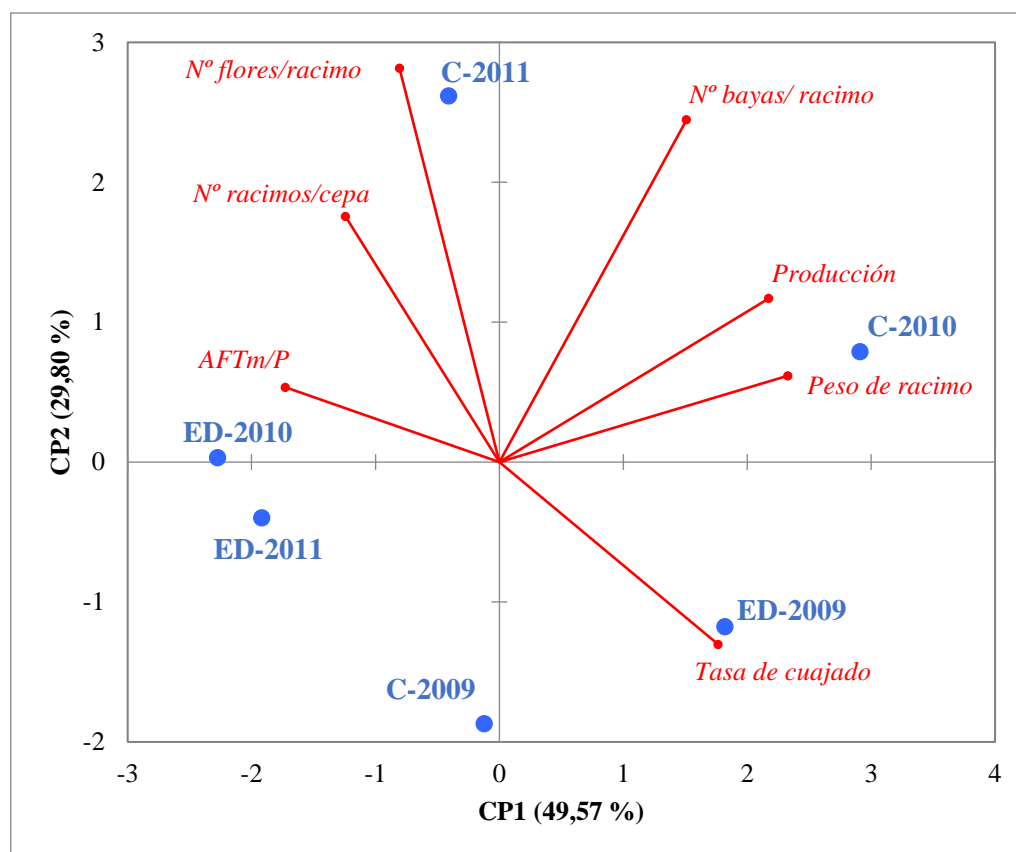


Figura 4.1. Análisis de componentes principales (ACP) realizado con los valores medios del número de flores por racimo, tasa de cuajado y de los componentes del rendimiento de cepas del cv. Tempranillo del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) durante las campañas 2009-2011.

4.1.3. Efecto del deshojado precoz sobre la evolución de las características físico-químicas de las uvas durante el período de la maduración

El deshojado precoz modifica el microclima del racimo y, por tanto, la velocidad y la forma de acumularse, transformarse y degradarse los metabolitos en la baya durante el periodo de maduración, con las consiguientes variaciones de su composición físico-química en el momento de vendimia (Poni et al., 2009).

Campaña 2009

La Figura 4.2 muestra la evolución de los parámetros incluidos en el análisis de la madurez de la pulpa, o madurez tecnológica. En esta campaña se muestrearon y analizaron semanalmente las bayas de ambos tratamientos (ED y C) desde que las uvas alcanzaron un valor de SST de 20 °Brix hasta la vendimia de las uvas C.

Las uvas se vendimiaron en función de su madurez tecnológica. Se consideró que las bayas habían llegado a la madurez tecnológica cuando el SST alcanzó el valor de 23-24 °Brix. En función de ello, las uvas ED se cosecharon con 24,4 °Brix el día 237 del año juliano (DDA) y las C con 23,5 °Brix una semana después (244 DDA).

Las gráficas muestran que, respecto del control, en los diferentes muestreos realizados el deshojado precoz no modificó significativamente los valores de los parámetros estudiados, y en las bayas de ambos tratamientos se observó una tendencia al incremento de los valores de SST y de pH, y el descenso de los valores del contenido de ácido málico (MH₂) y de acidez titulable (AT) típicos del proceso de maduración. Por tanto, la técnica del deshojado precoz no modificó sustancialmente la manera en cómo se acumulan y desaparecen los metabolitos durante la maduración. Sin embargo, para un mismo muestreo, las bayas ED tendieron a presentar valores ligeramente superiores de SST e inferiores de MH₂, AT y de la relación entre el ácido tartárico y el ácido málico (TH₂/MH₂) que las C. El ratio SST/AT, considerado a nivel enológico como indicador del grado de madurez tecnológica de las uvas, en general mostró valores superiores en ED que en C, y fue significativamente superior el 237 DDA.



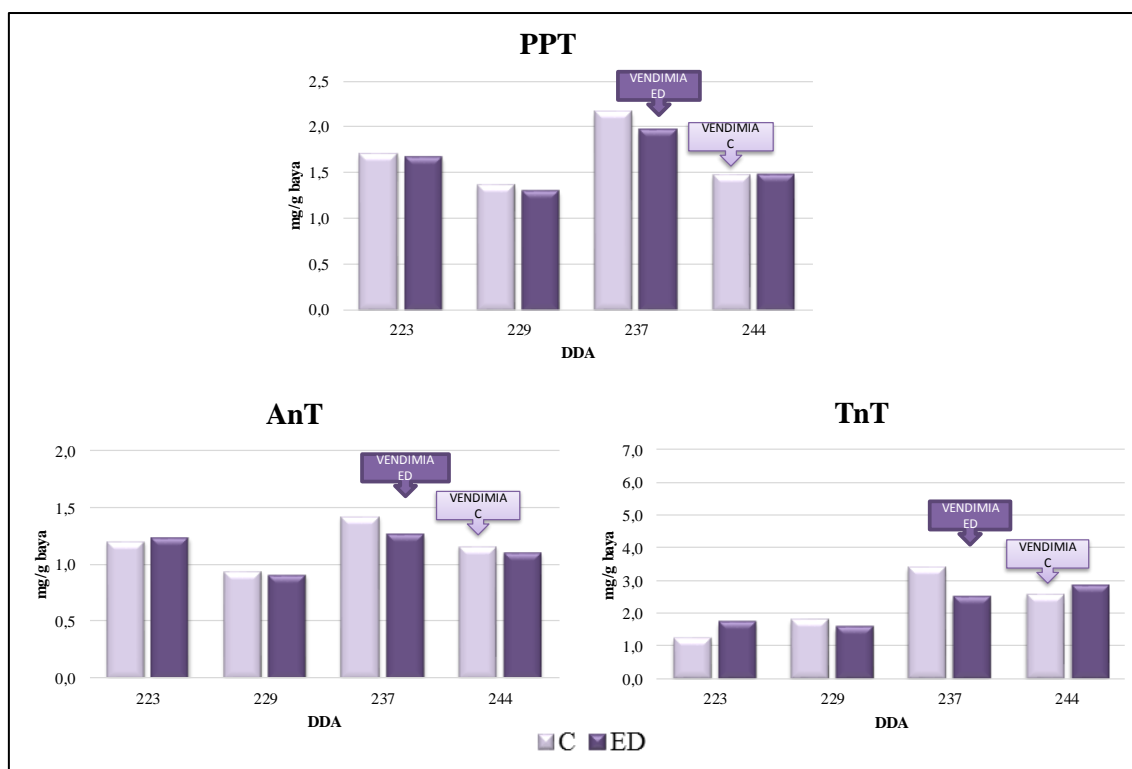
Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; *: indica significación a $p < 0,05$. SST, sólidos solubles totales (°Brix); AT, acidez titulable (g ácido tartárico/L); TH₂, ácido tartárico (g/L); MH₂, ácido málico (g/L); DDA: Día del año juliano.

Figura 4.2. Valores de los parámetros de madurez tecnológica de las uvas del cv. Tempranillo (campaña 2009) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).

La Figura 4.3 muestra la evolución de los parámetros referentes a la madurez fenólica de las uvas; PPT (potencial polifenólico total), AnT (contenido antociánico total) y TnT (contenido de taninos totales). Según refleja la Figura, los valores de estos parámetros fueron similares en las uvas de ambos tratamientos en todos los muestreos realizados. Estos resultados indican que el deshojado precoz no repercutió de forma significativa en la acumulación de sustancias fenólicas en las bayas.

Se consideró que las uvas ED estuvieron fenólicamente maduras el 237 DDA (valor máximo de AnT). En esta fecha, las uvas también habían alcanzado la madurez tecnológica. Sin embargo, en el tratamiento C el máximo de PPT y AnT se produjo una semana antes de alcanzar el valor de SST de vendimia (23,5 °Brix) y no se observó la coincidencia entre la madurez fenólica y tecnológica de las uvas.

El hecho de que en 2009 no se haya apreciado prácticamente ninguna diferencia significativa ni en los valores de los parámetros indicadores de la madurez tecnológica ni en los de la fenólica de las bayas puede ser debido, por un lado, a que la baja intensidad de la práctica del deshojado aplicado en este primer año de estudio haya provocado un escaso efecto del deshojado sobre la composición físico-química de las bayas en comparación con el tratamiento control ([Acimovic et al., 2016](#)), y por otro lado, a la capacidad amortiguadora de las cepas anteriormente comentada, a través de la movilización de reservas o compensación fotosintética ([Pallioti et al., 2010](#)).



PPT, potencial polifenólico total (mg ácido gálico/g baya); AnT, contenido antocianico total (mg cloruro de malvidina/g baya); TnT, contenido de taninos totales (mg catequina/g baya). DDA: Día del año juliano.

Figura 4.3. Valores de los parámetros de madurez fenólica del cv. Tempranillo (campaña 2009) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).

Campaña 2010

En el año 2010, los análisis comenzaron el 216 DDA cuando las uvas ED alcanzaron los 20 °Brix, y continuaron hasta el 264 DDA (una semana después de la cosecha de las uvas C). En esta campaña, las uvas se vendimiaron con valores próximos a los 23 °Brix (23 °Brix en C y 23,5 °Brix en ED).

La Figura 4.4 muestra la evolución de los parámetros de madurez tecnológica en la campaña 2010. Según refleja la Figura, durante todo el periodo analizado se observó la misma tendencia: el peso de las bayas ED fue menor y el SST mayor que las C. Los valores únicamente fueron significativamente diferentes en el muestreo 243 DDA. Respecto a los ácidos, los valores de AT y MH_2 mostraron una tendencia a presentar menores valores en ED que en C siendo la diferencia significativa en los muestreos 216 DDA, 252 DDA y 256 DDA para AT y 216 DDA para MH_2). En consecuencia, los valores de SST/AT de las bayas ED, fueron superiores ($p > 0,05$) a los de las C en todos los muestreos excepto en 252 DDA. A lo largo de todo el ciclo, excepto el 216 DDA, el

pH de las uvas ED, fue significativamente superior al de las C, y es de destacar que el incremento fue en aumento a lo largo del ciclo de maduración.

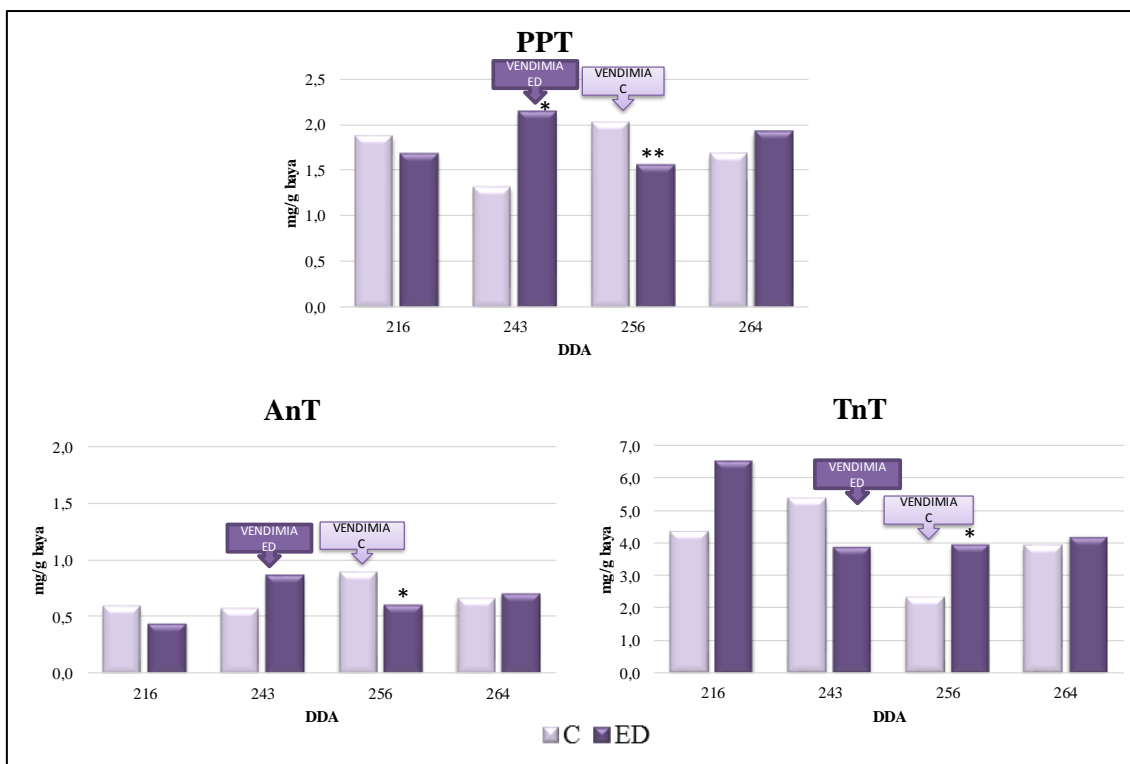
El resultado más destacable de esta campaña es que las uvas ED alcanzaron la madurez tecnológica, en fechas anteriores a las C. El valor del ratio de acumulación de azúcares diario ($^{\circ}\text{Brix}/\text{número de días}$) correspondientes al periodo 216-243 DDA fue 0,11 en ED, ligeramente superior al calculado en el tratamiento C (0,10) para el período 216 256 DDA.



Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; *, ** y ***, indican significación a $p<0,05$, $p<0,01$ y $p<0,001$ respectivamente. SST, sólidos solubles totales (°Brix); AT, acidez titulable (g ácido tartárico/L); TH₂, ácido tartárico (g/L); MH₂, ácido málico (g/L); DDA: Día del año juliano.

Figura 4.4. Valores de los parámetros de la madurez tecnológica de las uvas del cv. Tempranillo (campaña 2010) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).

La Figura 4.5 muestra los valores de los parámetros relativos a la madurez fenólica en las uvas control y en las sometidas al deshojado precoz del cv. Tempranillo (campaña 2010). El deshojado precoz también tuvo repercusión en la velocidad de acumulación de los metabolitos secundarios de la baya, y en la evolución de estos parámetros en las uvas C se observa cierto retraso respecto de las ED: en éstas últimas se alcanzó la madurez fenólica (valores máximos de PPT y AnT) en el muestreo 243 DDA, mientras que en C en el 256 DDA. Por tanto en ambos tratamientos, coincidieron las fechas de vendimia con la de la madurez fenólica. Los valores más altos de TnT se hallaron el 216 DDA en ED y el 243 DDA en C. Respecto al efecto del deshojado precoz sobre la concentración de compuestos fenólicos en las bayas durante el periodo de maduración, no se pudo establecer una tendencia clara a lo largo de todo el ciclo, pues dependiendo del muestreo se registraron incrementos y descensos significativos de PPT, AnT y TnT en los valores de ED respecto de los C.



Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; * y **: indican significación a $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente. PPT, potencial polifenólico total (mg ácido gálico/g baya); AnT, contenido antocianico total (mg cloruro de malvidina/g baya); TnT, contenido de taninos totales (mg catequina/g baya). DDA: Día del año juliano.

Figura 4.5. Valores de los parámetros de madurez fenólica de las uvas del cv. Tempranillo (campaña 2010) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).

Campaña 2011

Al igual que en la cosecha 2010, en el año 2011 se comenzaron los análisis cuando las uvas del tratamiento ED alcanzaron los 20 °Brix, y continuaron hasta una semana después de la vendimia del tratamiento C. En esta campaña, las uvas C y ED se vendimiaron con valores de SST de 23,2 y 23,4 °Brix respectivamente.

La Figura 4.6 muestra la evolución de los valores de los parámetros relativos a la madurez tecnológica en el cv. Tempranillo (campaña 2011). En los diferentes muestreos se observó la misma tendencia que en la campaña anterior: el valor del peso de las uvas ED fue menor ($p < 0,05$ en 230 DDA y 237 DDA) y el del SST mayor que los respectivos las uvas C. El efecto del deshojado sobre los valores del ácido tartárico y málico dependió del muestreo considerado, pues, aunque el efecto únicamente fue significativo en el último muestreo (250 DDA), en todos ellos la AT de las uvas C tendió a presentar valores más altos que los de las C. Ello provocó un aumento de los valores de la relación SST/AT, que fue significativo el 237 y 250 DDA. En esos mismos muestreos, el pH de las uvas ED, tendió a mostrar valores superiores respecto al de las C.

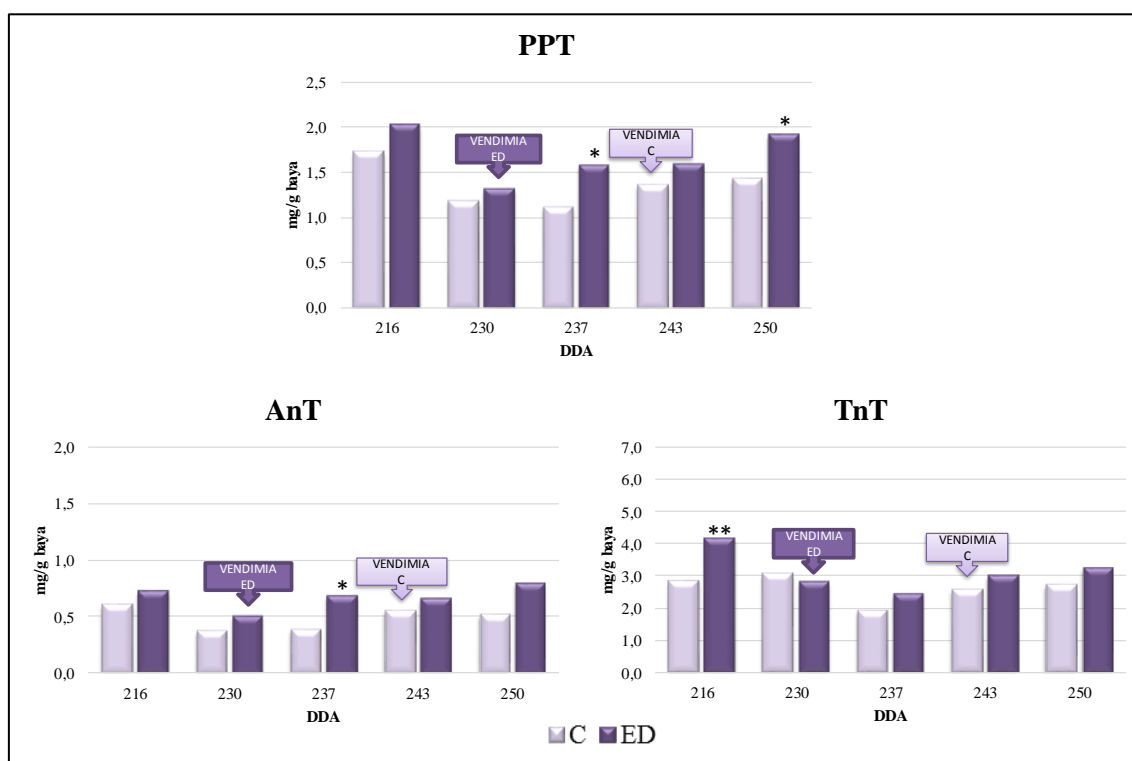


Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; * y **: indican significación a $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente. SST, sólidos solubles totales (°Brix); AT, acidez titulable (g ácido tartárico/L); TH₂, ácido tartárico (g/L); MH₂, ácido málico (g/L); DDA: Día del año juliano.

Figura 4.6. Valores de los parámetros estimadores de la madurez tecnológica en las uvas del cv. Tempranillo (campaña 2011) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).

En la Figura 4.7 se muestran los valores de los parámetros de la madurez fenólica en uva del cv. Tempranillo. En todos los muestreos se observó la misma tendencia: un mayor contenido de compuestos fenólicos en las uvas ED que en las C, siendo el efecto significativo únicamente en algunos momentos del ciclo. Respecto de las C, las uvas ED presentaron mayores valores de PPT ($p<0,05$) en los muestreos 237 y 250 DDA, y de AnT ($p<0,05$) en el 237 DDA. En relación al valor de TnT, únicamente se observaron mayores valores en ED ($p<0,05$) al inicio del ciclo de maduración en comparación con las bayas C.

En esta campaña, los valores máximos de AnT no se registraron en ninguno de los tratamientos en las respectivas fechas de vendimia ED y C, demostrando cierta asincronía entre las fechas correspondientes a la madurez tecnológica y la fenólica de las uvas de ambos tratamientos.



Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; * y **: indican significación a $p<0,05$ y $p<0,01$ respectivamente. PPT, potencial polifenólico total (mg ácido gálico/g baya); AnT, contenido antocianico total (mg cloruro de malvidina/g baya); TnT, contenido de taninos totales (mg catequina/g baya). DDA: Día del año juliano.

Figura 4.7. Valores de los parámetros de la madurez fenólica en las uvas del cv. Tempranillo (campaña 2011) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).

4.1.4. Efecto del deshojado precoz sobre la composición físico-química de la uva en el momento de vendimia

Los estudios que hasta la fecha han analizado los efectos del deshojado precoz en la composición físico-química de las uvas, mostos y vinos lo han hecho por lo general en uvas vendimiadas en idéntica fecha y con diferente contenido en SST. Sin embargo, desde el punto de vista vitícola, pero sobre todo enológico, es necesario disponer de resultados del efecto de esta práctica en uvas de similar contenido en SST para así poder evaluar su impacto sobre las características físico-químicas de vinos de similar graduación alcohólica. Esta Tesis estudia y analiza los resultados del efecto del deshojado precoz en la composición del cv Tempranillo en idéntico estado de maduración en un clima cálido y se ha considerado que las bayas están tecnológicamente maduras cuando el contenido en sólidos solubles totales (SST, ° Brix) alcanza el valor de 23-24 °Brix.

La Tabla 4.5 muestra los valores de los parámetros de la madurez tecnológica y la fenólica analizados en uvas a similar SST, es decir los correspondientes a las fechas de vendimia de cada tratamiento en cada uno de los tres años del estudio. Los resultados del ANOVA indican que, cuando se consideran los valores medios trianuales, el deshojado precoz únicamente tuvo efecto significativo ($p < 0,01$) sobre los valores del peso de baya y de K (menores y mayores respectivamente en ED vs C). Así mismo se apreció un efecto significativo del año en los valores de AT ($p < 0,001$), TH₂ ($p < 0,001$), SST/AT ($p < 0,001$), PPT ($p < 0,01$) y AnT ($p < 0,01$). Además, se observan interacciones significativas tratamiento x año en los parámetros TH₂ ($p < 0,01$), TH₂/MH₂ ($p < 0,01$) y TnT ($p < 0,01$).

En el año 2009, el deshojado precoz, en comparación con el tratamiento control, incrementó los valores de pH ($p < 0,01$) y disminuyó los de MH₂ ($p < 0,001$), aumentando así la relación TH₂/MH₂ ($p < 0,01$). En el 2010, el tratamiento ED mostró mayores valores de TH₂ ($p < 0,05$), incrementando el ratio TH₂/MH₂ ($p < 0,05$). En la campaña 2011 únicamente se observó un incremento del potasio ($p < 0,01$) de las bayas ED en comparación con las C. [Zheng et al. \(2017\)](#) obtuvieron resultados similares relativos al aumento de la relación TH₂/MH₂ observados en las campañas 2009 y 2010, en un trabajo realizado con el cv. Tempranillo cultivado en La Rioja cuando aplicaron un deshojado dos semanas tras el momento de cuajado.

Tabla 4.5. Composición físico-química de las uvas del cv. Tempranillo con similar concentración de sólidos solubles totales. (campañas 2009-2011) procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).

Parámetro	2009		2010		2011		2009-2011		Significación		
	C	ED	C	ED	C	ED	C	ED	Tr	Año	Tr x Año
Peso de baya (g)	2,0	1,8	2,2	1,7	2,1	1,8	2,1	1,8	**	ns	ns
SST (°Brix)	23,5	24,4	23,0	23,5	23,2	23,4	23,2	23,8	ns	ns	ns
pH	3,8	4,0**	3,8	3,8	3,7	3,7	3,8	3,8	ns	ns	ns
AT (g TH ₂ /L)	4,1	4,1	4,8	4,8	5,2	5,7	4,7	4,9	ns	***	ns
MH ₂ (g/L)	2,3	1,6**	2,3	2,0	1,9	2,0	2,1	1,9	ns	ns	ns
TH ₂ (g/L)	5,8	6,0	5,1	6,1*	4,9	4,6	5,3	5,6	ns	***	**
SST/AT	5,7	5,9	4,8	4,9	4,5	4,1	5,0	5,0	ns	***	ns
TH ₂ /MH ₂	2,6	3,7**	2,2	3,0*	2,6	2,4	2,5	3,0	ns	ns	**
K (g/L)	1,2	1,4	1,4	1,8	1,1	1,9**	1,2	1,7	**	ns	ns
PPT (mg/g)	1,5	2,0	2,0	2,1	1,4	1,3	1,6	1,8	ns	**	ns
AnT (mg/g)	1,2	1,3	0,9	0,9	0,5	0,5	0,9	0,9	ns	**	ns
TnT (mg/g)	2,5	2,5	2,3	3,9*	2,5	2,8	2,4	3,1	ns	ns	**

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento × año); *, **, *** y ns: indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y no significativo respectivamente. SST: Sólidos solubles totales; AT: Acidez titulable; MH₂: Ácido málico; TH₂: Ácido tartárico; K: Potasio; PPT: Potencial polifenólico total, mg ácido gálico/g baya; AnT: Contenido antocianico total, mg cloruro de malvidina/g baya; TnT: Contenido de taninos totales, mg catequina/g baya.

En la Tabla 4.6 se muestra la composición físico-química de los mostos C y ED de partida. El resultado del análisis de varianza muestra que el deshojado precoz, en comparación con el tratamiento control, provocó un descenso significativo ($p < 0,05$) de los valores medios trianuales de TH₂ en los mostos. También se observan interacciones significativas Tr x Año en los parámetros densidad ($p < 0,01$), TH₂ ($p < 0,01$) y TH₂/MH₂ ($p < 0,01$).

La composición físico-química de los mostos prácticamente no se vio alterada por el deshojado precoz. Únicamente, durante el año 2009, se observaron descensos significativos del pH y de MH₂ en el tratamiento ED vs C. Durante el resto de campañas no se halló efecto significativo sobre los parámetros analizados, aunque se observó una tendencia similar de descenso de MH₂ a la apreciada en 2009 en ED.

Tabla 4.6. Composición físico-química de los mostos del cv. Tempranillo (campañas 2009-2011) elaborados a partir de las uvas del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED).

Parámetro	2009		2010		2011		2009-2011		Significación		
	C	ED	C	ED	C	ED	C	ED	Tr	Año	Tr x Año
Densidad (g/L)	1107	1101	1099	1104	1102	1102	11023	1102	ns	ns	**
pH	3,7	3,4*	3,6	3,6	3,5	3,6	3,6	3,5	ns	ns	ns
AT (g TH ₂ /L)	5,2	4,8	5,5	4,2	5,2	5,7	5,3	4,9	ns	***	ns
MH ₂ (g /L)	2,3	1,7*	1,9	1,7	1,9	2,0	2,0	1,8	ns	ns	ns
TH ₂ (g/L)	5,5	4,9	4,4	4,5	4,9	4,6	4,9	4,7	*	***	**
TH ₂ /MH ₂	2,4	2,9	2,3	2,7	2,6	2,4	2,4	2,7	ns	ns	**

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento × año); *, **, *** y ns: indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y no significativo respectivamente. AT: Acidez titulable; MH₂: Ácido málico; TH₂: Ácido tartárico.

4.1.4.1. Análisis de componentes principales (ACP) de la composición de la baya en vendimia

Los valores de la composición físico-química de las bayas en fechas de vendimia de ambos tratamientos ED y C se sometieron a un análisis de componentes principales (ACP).

Un primer ACP (Figura 4.8) fue realizado con los valores medios de los parámetros enológicos de las bayas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento de deshojado precoz (ED) y control (C) muestreadas en la fecha de la vendimia en ED de las campañas 2009-2011 (237 DDA, 243 DDA y 230 DDA respectivamente). Los dos primeros componentes principales (CP) explican el 81,30 % de la varianza total, correspondiendo un 59,30 % al CP1 y un 21,97 % al CP2. El CP1 se define en su parte positiva por los sólidos solubles totales (SST), pH, ácido tartárico (TH₂), relación SST/AT, potencial polifenólico total (PPT) y el contenido antociánico total (AnT) y en la negativa por la acidez titulable (AT), peso de baya y el contenido de taninos totales (TnT). El CP2 se caracteriza en su parte positiva por el ácido málico (MH₂) y en su parte negativa por la relación TH₂/MH₂. En los años 2009 y 2010, en la fecha de vendimia ED, las uvas de este tratamiento mostraron mayor grado de madurez tecnológica (mayor SST, pH, SST/AT y menor peso de baya y AT) y fenólica (mayor PPT y AnT), en comparación con el tratamiento C. En la campaña 2011, ambos tratamientos se caracterizaron por un alto valor de AT.

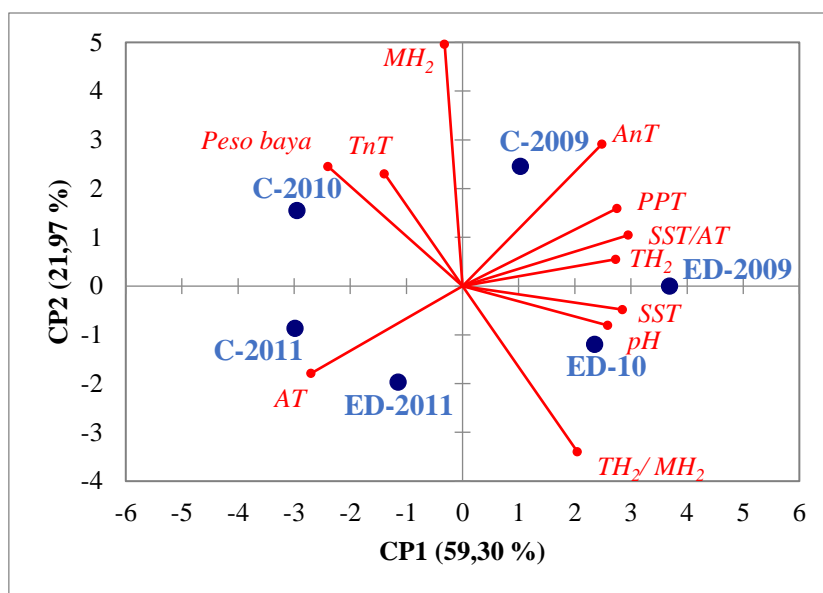


Figura 4.8. Análisis de componentes principales (ACP) realizado con los valores medios de los parámetros enológicos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED), en el momento de la vendimia ED (campañas 2009-2011).

Un segundo ACP (Figura 4.9) se aplicó a los valores medios de los parámetros enológicos de las bayas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento de deshojado precoz (ED) y control (C) en el momento de vendimia en el tratamiento C, en las campañas 2009-2011 (244 DDA, 256 DDA y 243 DDA respectivamente). Los dos primeros CP explican el 76,5 % de la varianza total, correspondiendo un 50,74 % al CP1 y un 25,84 % al CP2. El CP1 se define, por los parámetros de SST, TH_2 , relación TH_2/MH_2 , relación SST/AT y AnT en su parte positiva y por AT y peso de baya en su parte negativa. El CP2 se caracteriza, en su parte positiva por la TnT y en su parte negativa por el MH_2 , pH y PPT. En este caso, las muestras se distribuyen en tres grupos bien diferenciados, correspondientes a las tres campañas del estudio. Únicamente en el caso del 2010 se observó una diferenciación entre los tratamientos C y ED, de forma que ED se caracterizó por un mayor contenido de SST, TH_2 , TH_2/MH_2 , SST/AT y pH frente a C, que mostró mayores valores de MH_2 y PPT.

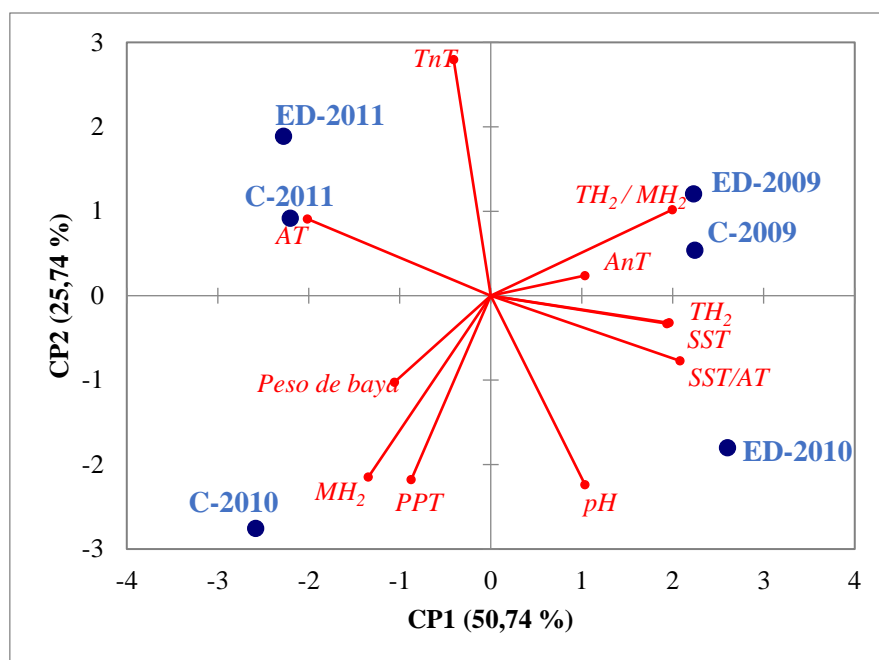


Figura 4.9. Análisis de componentes principales (ACP) realizado con los valores medios de los parámetros enológicos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED), en el momento de la vendimia C (campañas 2009-2011).

El tercer ACP (Figura 4.10) se realizó con los valores medios de los parámetros enológicos de las bayas del cv. Tempranillo procedentes de los tratamientos de deshojado precoz (ED) y control (C) a similar contenido de SST, durante las campañas 2009-2011. Los dos primeros componentes principales explicaron el 76,6 % de la varianza total, correspondiendo un 50,67 % al CP1 y un 25,95 % al CP2. El CP1 quedó definido por la relación SST/AT, pH, TH₂, PPT, TH₂/MH₂ y AnT en su parte positiva y por AT en la parte negativa. El CP2 se caracterizó, en su parte positiva por MH₂ y el peso de baya, mientras que en la parte negativa quedó definida por K y TnT. El ACP permitió diferenciar los tratamientos ED, situados fundamentalmente en la parte positiva del eje CP1 de los tratamientos C situados en la parte negativa del mismo eje.

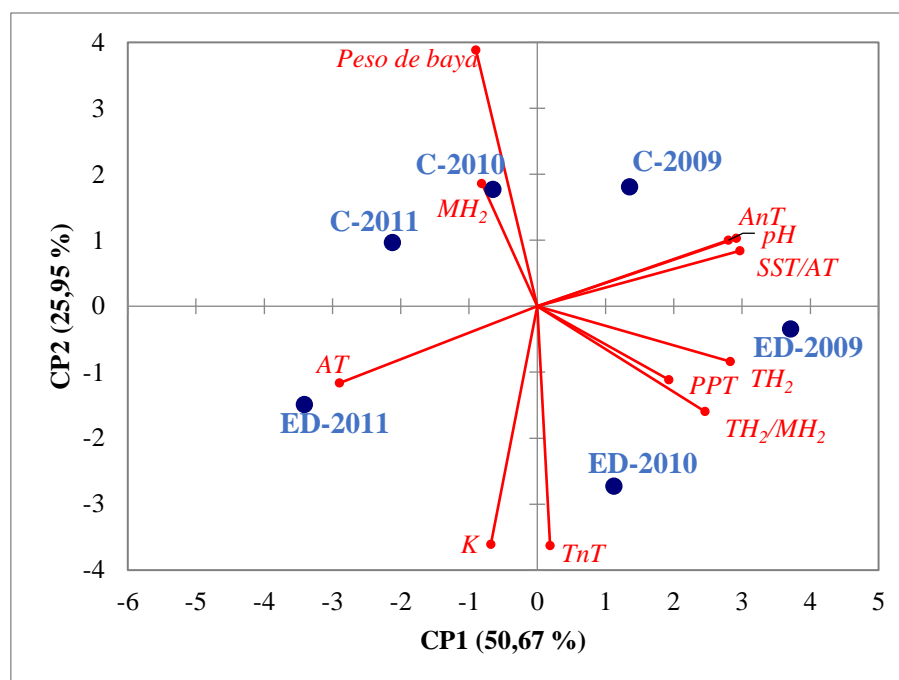


Figura 4.10. Análisis de componentes principales (ACP) realizado con los valores medios de los parámetros enológicos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes de los tratamientos de deshojado (ED) y control (C) con uvas de similar contenido en sólidos solubles totales (campañas 2009-2011).

De los resultados obtenidos se deduce que, en la mayoría de los parámetros que definen la calidad de la uva, el sentido del efecto del deshojado precoz fue similar en los tres años del estudio, sin embargo, su amplitud y significancia dependió en gran medida de las condiciones climáticas de la campaña considerada y de la intensidad con que se efectuó el deshojado precoz, ya que, como se ha comentado anteriormente, en 2009 no se eliminaron las hojas de los brotes anticipados. En lo que se refiere al efecto año, estudiado también por otros investigadores ([Poni et al., 2006](#)), los resultados muestran que el mayor impacto se produjo en el año más húmedo. Además, los resultados obtenidos también indican que podría existir una determinada intensidad umbral de deshojado precoz para observar un efecto significativo sobre la composición físico-química de la baya, ya demostrada en investigaciones previas ([Acimovic et al., 2016](#)). La menor intensidad con la que se realizó el deshojado precoz en 2009, podría ser uno de los motivos por el que en dicha campaña apenas se percibieran cambios significativos en los parámetros analizados en las uvas ED frente a las C. Resultados semejantes obtuvieron [Risco et al. \(2014\)](#) en el cv. Tempranillo cultivado en Requena (Valencia) y [Salvi et al. \(2017\)](#) en el cv. Foglia Tonda en Siena (Italia). En el año 2010 la mayor intensidad de la práctica de deshojado precoz, sumado a las características climatológicas de dicha campaña,

favorecieron la diferencia de los valores en los parámetros tecnológicos entre los tratamientos C y ED.

En lo referente al efecto del deshojado precoz sobre el peso de baya, los resultados obtenidos en investigaciones previas no son siempre concordantes entre sí, y parecen depender de la interacción entre la variedad y el terroir. En un estudio realizado con el cv. Tempranillo en la Rioja, [Diago et al. \(2012\)](#) no observaron efecto sobre el peso de baya como respuesta al deshojado precoz, pero sí en el cv. Graciano. Posteriormente, [Risco et al. \(2014\)](#) hallaron descensos del peso de baya al aplicar esta técnica en el cv. Tempranillo en Requena. Por otra parte, [Otero \(2015\)](#) observó que el peso de las bayas procedentes del cv. Albariño sometido a deshojado precoz fue similar al de las de las cepas sin deshojar. En el presente estudio, a lo largo de los tres años analizados, el peso de las bayas en el tratamiento ED tendió siempre a estar por debajo de las del tratamiento C. Según algunos autores, la limitación de la fuente de carbono durante la etapa temprana de su desarrollo de la baya es la causa de la disminución de su peso en el tratamiento de deshojado precoz ([Poni et al., 2006](#), [Poni et al., 2008](#), [Intrieri et al., 2008](#), [Lohitnavy et al., 2010](#), [Tardaguila et al., 2010](#)). Otros indican que este efecto estaría contrarrestado por el aumento de temperatura y la mayor exposición solar de los racimos en las cepas deshojadas ([Poni y Bernizzoni, 2010](#)).

Por otra parte, en todos los años de estudio y, de una manera más notable durante el segundo año, para una misma fecha de muestreo, se observó una tendencia al aumento del contenido en SST de las bayas procedentes de cepas deshojadas en comparación a las procedentes de las cepas control. Este resultado se ha confirmado previamente en estudios realizados en otros cultivares y condiciones edafoclimáticas distintas ([Poni et al., 2006](#); [Guidoni et al., 2008](#); [Intrieri et al., 2008](#); [Poni et al., 2009](#); [Diago et al., 2010](#); [Risco et al., 2014](#); [Otero, 2015](#)). Diferentes fenómenos pueden citarse para justificar este efecto. Uno de ellos es la modificación y mejora del microclima de la canopia provocado por el deshojado precoz, pues en el período inmediatamente posterior al deshojado, los racimos experimentan un aumento en la exposición solar y la temperatura que generalmente se prolonga en el tiempo. En este sentido, el estudio de [Risco et al. \(2014\)](#), anteriormente citado, y el de [Alessandrini et al. \(2018\)](#), con el cv. Semillon en Italia, han indicado aumentos de 1-2 °C en las uvas procedentes de cepas sometidas a un tratamiento de deshojado precoz en comparación con las cepas control.

Por otra parte, a la capacidad de compensación fotosintética de las hojas que se mantienen en la cepa después de un deshojado, y a la mayor translocación de carbohidratos, tanto desde el tronco y las raíces hacia los racimos, como desde la zona apical hacia la base del pámpano en las cepas deshojadas, hay que añadir que para contrarrestar la superficie foliar eliminada, la cepa promueve la brotación y crecimiento de los brotes secundarios cuya importancia como exportadores netos de carbohidratos ha sido ampliamente demostrada por diferentes investigadores (Quinlan y Weaver, 1970; Candolfi-Vasconcelos et al., 1994; Palliotti et al., 2000; Vasconcelos y Castagnoli, 2000; Poni et al., 2006; Poni et al., 2008). Sin embargo, hay que considerar que esta respuesta fotosintética compensatoria únicamente se desencadena si se compromete notablemente la relación hoja/fruto (Candolfi- Vasconcelos et al., 1994) y esta sería otra de las razones por las que el efecto del deshojado precoz fue desigual en las tres campañas.

Finalmente, la relación AFTm/P, que se vio afectada de forma diferente en las distintas campañas (Tabla 4.4), también pudo afectar a los valores de SST hallados en C y ED. Este ratio es un índice comúnmente empleado para expresar el balance entre la capacidad fuente de las cepas y la demanda de fotoasimilados por parte de los racimos (Kliewer y Dokoozlian, 2005). La relación entre su valor y el azúcar acumulado en las bayas del cv. Tempranillo fue mostrada por Diago (2010), quien halló una correlación positiva y lineal significativa entre ambos parámetros.

Distintos estudios indican la existencia de diferentes interacciones entre genotipo y entorno en la respuesta a las técnicas de deshojado sobre parámetros de acidez y pH (Bavaresco et al., 2008; Guidoni et al., 2008). Para una misma variedad, el efecto del deshojado precoz difiere en función de la intensidad con que se efectúe (Otero, 2015) o de la campaña considerada (Diago, 2010). En el presente trabajo se hallaron incrementos de pH en los tratamientos ED respecto de los C. Estos resultados, que concuerdan con los hallados por Risco et al. (2014) en la misma variedad y bajo condiciones climáticas similares, indican que, en términos de AT, la práctica del deshojado precoz no resultaría conveniente en los climas semiáridos debido a la baja acidez que se obtiene en el cv Tempranillo en estas zonas.

Los ácidos tartárico y málico representan entre un 69 % y un 92 % de todos los ácidos orgánicos presentes en las uvas, y son los que de mayor modo determinan la acidez total y el pH (Kliewer y Nassar 1966). La tendencia a presentar menores valores de MH₂ en

las uvas ED respecto de las C durante el ciclo de maduración en la campaña 2010, se explicaría en base a la modificación del microclima del racimo debido a la mayor intensidad del deshojado practicada ese año (Tabla 4.2, epígrafe 4.1.2). Esta menor área foliar habría provocado el aumento de temperatura incrementando la respiración celular y por tanto habría acelerado la degradación del ácido málico (Ruffner, 1982; Conde et al., 2007). Sin embargo, no se ha observado una tendencia clara en el efecto del deshojado precoz en los valores de ácido tartárico y los resultados hallados en la bibliografía tampoco son siempre concordantes. Diago (2010) halló diferentes respuestas en función del cultivar y año de estudio. En dicho trabajo, en el cv Tempranillo observó una reducción en la concentración de ácido tartárico provocada por el deshojado en prefloración en los dos años de estudio. En el mismo estudio, en la variedad Graciano halló un descenso de este ácido en uno de los dos años, mientras que en la variedad Mazuelo halló un incremento en su concentración provocado por el deshojado precoz en ambos años. Diversos autores han observado incrementos del ácido tartárico en mostos procedentes de cepas deshojadas respecto a las uvas control, hecho que puede ser explicado por el aumento repentino de la luz y la temperatura provocado por el deshojado precoz, que conduciría a una mayor síntesis de dicho ácido (Poni et al., 2006; Tardaguila et al., 2008; Tardaguila et al., 2010; Risco et al., 2014).

Por otra parte, es de destacar que la relación TH_2/MH_2 durante el proceso de maduración, fue similar en las uvas de ambos tratamientos (ED y C) en los años 2009 y 2011 y aumentó, en la mayor parte de los muestreos, en las uvas procedentes de cepas deshojadas frente a las control en el 2010. Los resultados de esa campaña 2010, concuerdan con los trabajos de Zheng et al. (2017) anteriormente citado. Generalmente, para la elaboración de vinos se prefieren unos valores elevados del ratio TH_2/MH_2 , pues el TH_2 es un ácido más estable que el MH_2 y que puede mejorar la calidad del mismo, especialmente en el caso de vinos blancos producidos en climas más fríos (Kaserer et al., 1996).

Es de destacar que, desde el punto de vista cuantitativo, fue durante la campaña 2011 en la que se hallaron los menores valores de AnT de las uvas a fecha de vendimia. En los trabajos de Diago (2010) y Diago et al. (2012a), únicamente se halló un incremento en la concentración total de antocianos en los tratamientos ED durante su primer año de estudio. Risco et al. (2014) encontraron un incremento en la concentración de compuestos

fenólicos en mostos de cepas del cv. Tempranillo cultivadas en climatología semiárida (Requena, Valencia) provocados por el deshojado precoz. [Bubola et al. \(2017\)](#) observaron que el deshojado precoz incrementó la concentración de fenoles totales y de antocianos en las uvas del cv. Teran cultivado en Croacia. La tendencia en el tratamiento ED a presentar una mayor concentración de sustancias fenólicas de las uvas durante el ciclo de maduración fue observada sobre todo durante la campaña 2011 (Fig. 4.7). Esta tendencia puede ser consecuencia de los efectos provocados por el deshojado precoz, entre los que pueden citarse el efecto acumulativo observado en los componentes del rendimiento a lo largo de los tres años de estudio ([Candolfi-Vasconcelos y Koblet, 1990](#)), y a la tendencia a disminuir el peso de las bayas procedentes del tratamiento ED con respecto a C durante el ciclo de maduración (Fig. 4.6). Según [Roby et al. \(2004\)](#) el mayor valor del ratio superficie/volumen de las bayas más pequeñas, provoca un aumento de la concentración de sustancias fenólicas localizadas en el hollejo. Por otra parte, la variación de la temperatura del racimo como consecuencia de la alteración del microclima provocada por el deshojado precoz también afecta a la composición antociánica de la baya, puesto que existe un efecto combinado de la radiación solar y la temperatura de las bayas ([Risco et al., 2014; Bergqvist et al., 2001; Mori et al., 2007; Tarara et al., 2008](#)). En su estudio realizado en Tempranillo cultivado en La Rioja (España), [Zheng et al. \(2017\)](#) también observaron un incremento de la concentración de antocianos provocada por un deshojado efectuado dos semanas tras el cuajado, aunque sólo fue significativo el primer año de estudio.

Como ya se ha comentado anteriormente, uno de los problemas más acuciantes de la viticultura actual es la asincronía que se observa entre la acumulación de azúcares y la de polifenoles en las bayas, de ahí que el paliar este problema es objetivo prioritario a la hora de evaluar el efecto de una nueva técnica vitícola. En este sentido, en el 2009 mediante el deshojado precoz sí se consiguió sincronizar los los máximos valores de SST, AnT y PPT. En el 2010, la madurez tecnológica de las bayas coincidió con la fenólica en ambos tratamientos. En el año 2011, se observó que en el tratamiento ED la maduración fenólica mostró un retraso respecto a la maduración tecnológica (SST), sin embargo, en las del tratamiento C ambas maduraciones, fenólica y tecnológica coincidieron.

Por tanto, de los tres años del estudio puede concluirse que el deshojado precoz provocó un cierto adelanto en la maduración fenólica y tecnológica con respecto a las

cepas del tratamiento control. Sin embargo, la sincronización entre la madurez fenólica y tecnológica en ambos tratamientos (C y ED) fue dependiente del año de estudio.

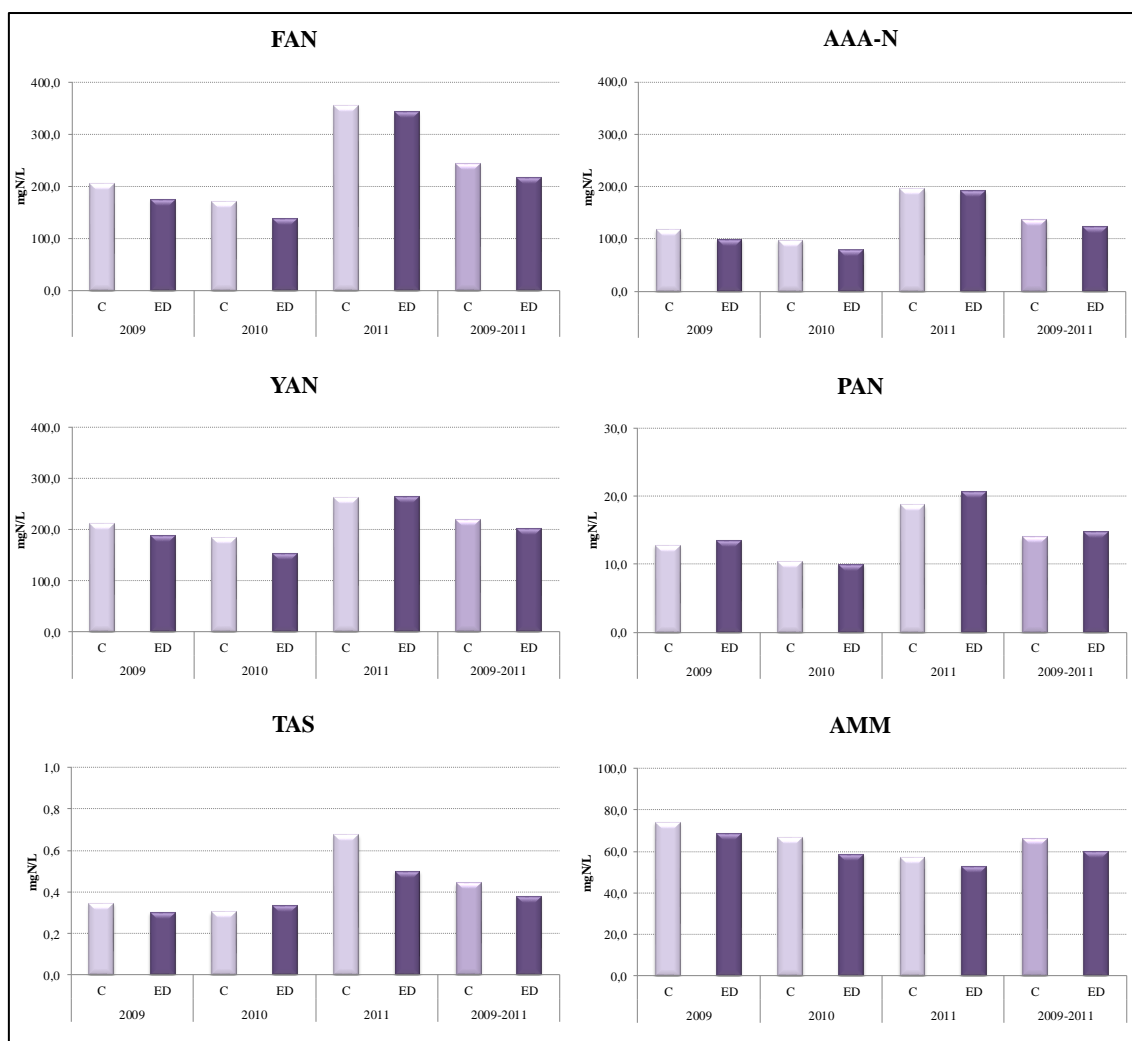
4.2. Efecto del deshojado precoz sobre la composición nitrogenada de la uva

4.2.1. Índices nitrogenados y familias aminoacídicas

En la Figura 4.11 se muestran los valores anuales (2009-2011) y los valores medios trianuales del nitrógeno aminoacídico total (FAN), nitrógeno aminoacídico asimilable (AAA-N), nitrógeno asimilable por las levaduras (YAN), precursores aromáticos nitrogenados (PAN), nitrógeno azufrado total (TAS) y el amonio (AMM) hallados en las uvas Tempranillo del tratamiento control (C) y en las del deshojado precoz (ED) correspondientes a las respectivas fechas de vendimia de cada tratamiento. Por tanto, se trata de uvas de similar valor de SST (23-24 °Brix en todos los casos). Junto a la Figura se adjuntan los resultados del ANOVA efectuado para analizar los efectos del tratamiento (Tr), el año y la interacción entre ambos.

Respecto del tratamiento control, la práctica del deshojado precoz no modificó significativamente los valores medios trianuales de los índices nitrogenados FAN, AAA-N, YAN, AMM y TAS. ni del amonio, aunque en todas las campañas analizadas se observó una tendencia al descenso en los valores de dichos parámetros en las uvas ED, que nunca superó el 20 %. Sin embargo, los valores del PAN fueron similares en las uvas de ambos tratamientos en las campañas 2009 y 2010, y en 2011 se registró un ligero incremento, no significativo, de los valores hallados en ED respecto de los C. El efecto año fue significativo en todos los parámetros analizados. La interacción Tr x Año no tuvo significación estadística en ninguno de los parámetros aquí evaluados.

Los mayores valores de FAN (356,2 y 343,5 mgN/L en C y ED respectivamente) y de YAN (262,9 y 264,4 mgN/L en los mismos tratamientos) se hallaron el año 2011, y los menores en 2010 (171 y 137,6 mgN/L en el caso del FAN; 183,1 y 153,4 en YAN en C y ED respectivamente). Según diferentes investigaciones son necesarios valores de YAN superiores a 150 mgN/L para que las levaduras puedan llevar a cabo la fermentación completa de los azúcares presentes en los mostos ([Blouin y Peynaud, 2004](#); [Suárez et al., 2003](#)). Por tanto, en todas las campañas estudiadas, los mostos de ambos tratamientos presentaron cantidades suficientes de materia nitrogenada para finalizar la fermentación de los azúcares de los correspondientes mostos.



Significación	FAN	AAA-N	YAN	PAN	TAS	AMM
Tr	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Año	***	**	***	***	*	*
Tr x Año	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento \times año); *, **, *** y ns: indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y no significativo respectivamente. FAN: Nitrógeno aminoacídico total; AAA-N: Nitrógeno aminoacídico asimilable; YAN: Nitrógeno asimilable por las levaduras; PAN: Precusores aromáticos nitrogenados; TAS: Nitrógeno azufrado total; AMM: Amonio.

Figura 4.11. Concentración de los índices nitrogenados (mgN/L) de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).

Los aminoácidos se agruparon en función de sus rutas de biosíntesis y enlaces a vías metabólicas centrales en las siguientes familias:

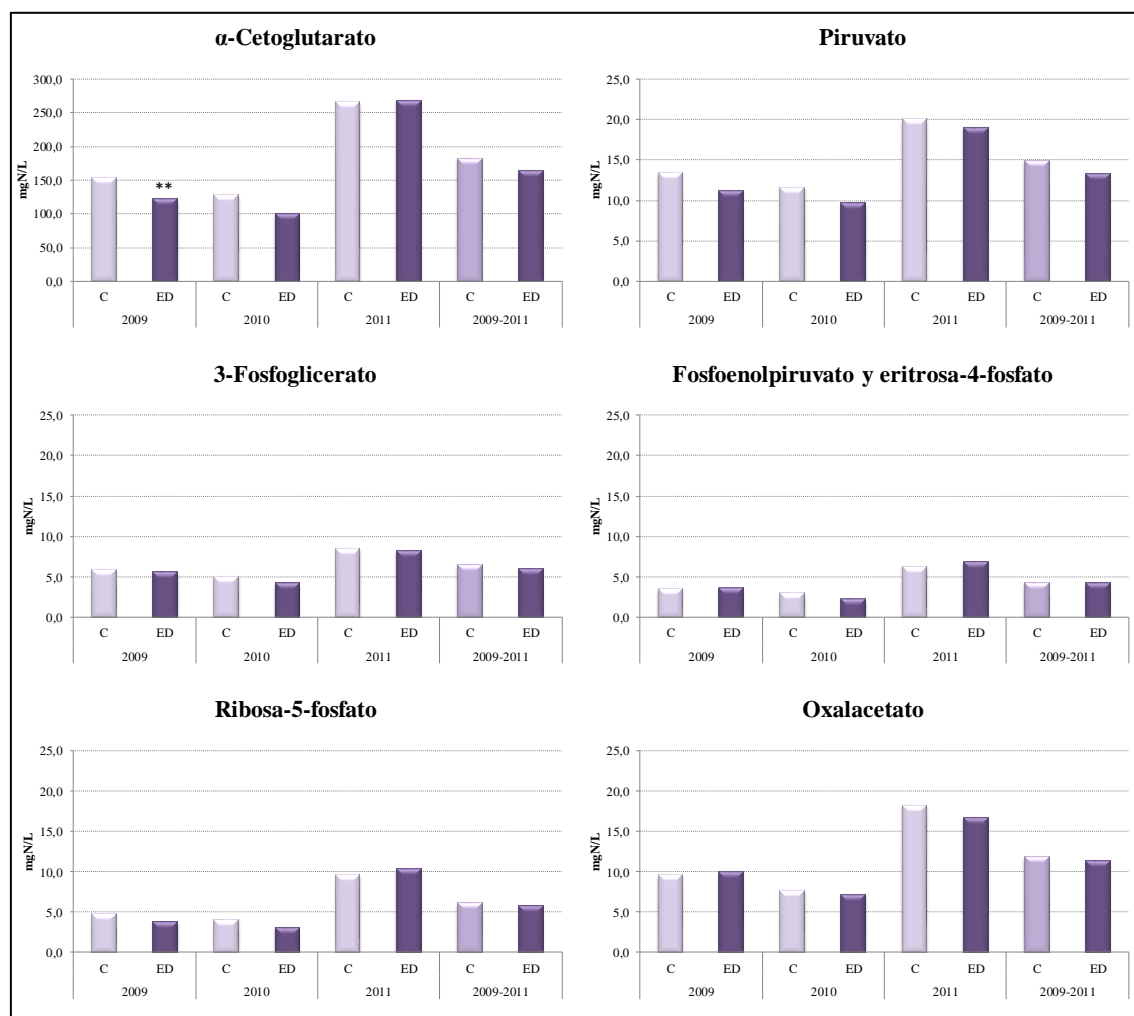
- *α-Cetoglutarato*: Arg, Glu, Gaba y Pro.
- *Oxalacetato*: Asn, Asp, Ileu, Lys, Met y Thr.
- *Piruvato*: Ala, Leu y Val.
- *3-Fosfoglicerato*: Gly, Ser y Cys.
- *Fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato*: Phe, Tyr y Trp.
- *Ribosa-5-fosfato*: His.

La Figura 4.12 refleja los valores anuales y la media trianual de estas familias en las uvas analizadas. Independientemente del tratamiento experimental y del año analizado, la familia aminoacídica más abundante en las uvas fue la del α -cetoglutarato, que representó en torno a un 80 % de la concentración total media de los tres años (años 2009-2011), seguida de la del piruvato (7 %), oxalacetato (5 %), 3-fosfoglicerato (3 %), ribosa-5-fosfato (3 %), fosfoenolpiruvato y 4-eritrosa fosfato (2 %). Esta distribución es similar a la indicada por otros autores en las uvas Tempranillo cultivadas en la Rioja ([Garde-Cerdán et al., 2014](#)).

La Figura 4.12 muestra que no existe una norma general sobre el efecto del deshojado precoz, pues la tendencia y significancia depende, tanto de la familia, como de la campaña analizada. En la familia α -cetoglutarato, únicamente en el 2009 se halló un descenso significativo en ED respecto de C. En el resto de las familias, el deshojado precoz no tuvo efecto significativo en ninguna de las campañas, aunque es de destacar que los valores de la familia piruvato y 3-fosfoglicerato de las uvas ED tendieron a mantenerse por debajo de las C en los tres años del estudio. Tampoco se hallaron diferencias significativas en la media trianual de los valores C y ED de ninguna de estas familias aminoacídicas.

El año tuvo efecto significativo en todas las familias aminoacídicas. En todas ellas, los valores mínimos se registraron en la campaña 2010 y los máximos en 2011. Entre los valores correspondientes a esos años, las variaciones de mayor amplitud se observaron en la familia ribosa-5-fosfato (130,2 % en C y 175,0 % en ED), y las de menor en la del piruvato (59,8 % en C y 83,9 % en ED), y fueron siempre mayores en las uvas ED respecto

a las C. Al igual que en los índices anteriormente comentados tampoco fue significativo el efecto Tr x Año.



Significación	α-cetoglutarato	Piruvato	3-Fosfoglicerato	Fosfoenolpiruvato y Eritrosa-4-fosfato	Ribosa-5-Fosfato	Oxalacetato
Tr	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Año	***	***	***	***	***	***
Tr x Año	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento × año); ** y *** y ns: indican significación a $p < 0,01$, $p < 0,001$ y no significativo respectivamente.

Figura 4.12. Concentración de las familias aminoacídicas (mgN/L) de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamientos (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) en los correspondientes momentos de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).

4.2.2. Perfil aminoacídico

La Tabla 4.7 refleja los contenidos de los aminoácidos de las uvas C y ED, muestreadas en sus respectivas fechas de vendimia en las campañas 2009, 2010 y 2011. Se trata por tanto de uvas con similar contenido de SST en todos los casos. También se incluyen los valores de Tau (compuesto azufrado constituido por los aminoácidos Cys y Met) y de las aminas Ethan y Pea.

Las concentraciones de todos los aminoácidos identificados y cuantificados en estas uvas se encuentran dentro de los rangos hallados en diferentes variedades de uva según la revisión bibliográfica de [Bell y Henschke \(2005\)](#), y son superiores a los hallados en las uvas de esta variedad cultivada en otras zonas vitícolas ([Henández-Orte et al., 1999](#); [Garde-Cerdán et al., 2014](#); [González-Santamaría et al., 2017](#)). [Lee y Schreiner \(2010\)](#) mostraron el efecto y la importancia del procedimiento de extracción cuando se cuantifican los aminoácidos libres de la uva. Por tanto, cuando se comparan los valores de YAN de uvas de la misma variedad procedentes de diferentes terroirs hay que considerar las metodologías analíticas empleadas.

En todas las uvas analizadas, independientemente del tratamiento experimental y año los aminoácidos más abundantes fueron: Arg, Pro, Glu, Ala y Gaba. La suma de los contenidos medios de estos aminoácidos representó el 78,9 % del FAN medio trianual. Frente a éstos, el porcentaje de Lys, Gly, Orn, Met, Pea y Cys únicamente significó el 0,9 % de ese índice, por lo que estos últimos pueden considerarse aminoácidos minoritarios en estas uvas. Estos resultados concuerdan con los de otros trabajos que han identificado y cuantificado aminoácidos en uvas de variedades tintas ([Spayd y Andersen-Bagge, 1996](#); [Stines et al., 2000](#)). [Hernández-Orte et al. \(1999\)](#) hallaron que Arg, Pro, His y Glu eran los aminoácidos mayoritarios de las uvas procedentes de cepas de esta variedad cultivadas en el Somontano, y posteriormente [Pascual et al. \(2015\)](#) indicaron que la Arg, Lys, Pro y Gln eran los más abundantes en las bayas procedentes del mismo cultivar y zona. En un estudio realizado en la Rioja [Garde-Cerdán et al. \(2016\)](#) también observaron que la Arg, Pro, Gln, Glu y GABA eran los aminoácidos mayoritarios de las uvas del cv. Tempranillo.

Tabla 4.7. Concentración de aminoácidos identificados en uvas del cv. Tempranillo (campañas 2009-2011) Tempranillo procedentes del tratamiento (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) en los correspondientes momentos de vendimia C y ED de las campañas 2009-2011.

Aminoácido mgN/L	2009		2010		2011		2009-2011		Significación		
	C	ED	C	ED	C	ED	C	ED	Tr	Año	Tr x Año
Alanina (Ala)	10,17	8,18	8,89	7,06	15,39	14,40	11,48	9,88	**	***	ns
Arginina (Arg)	65,88	53,97	59,92	46,47	107,85	107,86	77,88	69,43	ns	***	ns
Asparagina (Asn)	1,75	1,26	1,23	0,95	6,31	4,05*	3,10	2,09	*	***	ns
Ácido aspártico (Asp)	2,37	3,83*	2,02	2,21	3,15	4,71*	2,51	3,58	**	***	ns
Cistina (Cys)	0,02	0,01	0,01	0,02	0,11	0,09*	0,05	0,04	*	ns	*
Citrulina (Cit)	1,45	1,32	1,38	1,19	2,16	2,25	1,66	1,59	ns	*	ns
γ -amino-butírico (Gaba)	11,03	6,78	7,86	4,83	14,97	11,11*	11,29	7,57	**	***	ns
Ácido glutámico (Glu)	11,46	9,71	7,57	8,76	13,59	13,37	10,87	10,61	ns	***	ns
Glicina (Gly)	0,67	0,42	0,52	0,34	0,95	0,71	0,71	0,49	**	***	ns
Histidina (His)	4,77	3,79	3,90	3,11	9,53	10,33	6,07	5,74	ns	***	ns
Hidroxiprolina (Hypro)	2,35	3,80	2,01	2,18	6,48	9,69*	3,61	5,22	**	***	ns
Isoleucina (Ile)	0,64	0,55	0,45	0,44	1,11	1,05	0,73	0,68	ns	***	ns
Leucina (Leu)	1,04	0,84	0,79	0,69	1,66	1,28	1,16	0,94	ns	***	ns
Lisina (Lys)	0,74	0,41	0,49	0,37	1,19	0,41*	0,81	0,40	**	*	ns
Ornitina (Orn)	0,38	0,23	0,36	0,34	0,53	0,48	0,42	0,35	ns	ns	ns
Fenilalanina (Phe)	0,67	0,63	0,49	0,43	0,99	0,92	0,72	0,66	ns	**	ns
Fenilserina (Phser)	0,42	0,23	0,28	0,15	0,97	0,93	0,56	0,44	ns	***	ns
Prolina (Pro)	65,25	51,66	52,57	40,63	129,74	136,55	82,52	76,28	ns	***	ns
Sarcosina (Sarc)	1,07	0,89	0,61	0,53	2,23	1,52	1,30	0,98	*	***	ns

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento \times año); *, **, *** y ns: indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y no significativo respectivamente.

Tabla 4.7. Continuación.

Aminoácido mgN/L	2009		2010		2011		2009-2011		Significación		
	C	ED	C	ED	C	ED	C	ED	Tr	Año	Tr x Año
Serina (Ser)	5,19	5,15	4,49	3,89	7,52	7,46	5,73	5,50	ns	***	ns
Treonina (Thr)	3,82	3,71	3,13	2,86	6,08	5,97	4,34	4,18	ns	***	ns
Triptófano (Trp)	2,06	2,18	1,80	1,29	3,98	4,21	2,61	2,56	ns	***	ns
Tirosina (Tyr)	0,85	0,82	0,74	0,59	1,24	1,73	0,94	1,05	ns	***	ns
Valina (Val)	2,99	2,75	2,54	2,42	4,13	4,38	3,22	3,18	ns	***	ns
Taurina (Tau)	6,13	5,65	4,92	4,29	7,06	6,76	6,04	5,57	*	**	ns
Metionina (Met)	0,29	0,26	0,27	0,29	0,35	0,49	0,30	0,35	ns	ns	ns
Etanolamina (Ethan)	2,16	1,65	1,61	1,05*	2,79	2,82	2,19	1,84	*	***	ns
Feniletilamina (Pea)	0,09	0,19	0,09	0,21	0,18	0,38*	0,12	0,26	*	*	ns
Pro/Arg	0,99	0,96	0,88	0,87	1,24	1,27	1,04	1,03	ns	*	ns

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento × año); *, **, *** y ns: indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y no significativo respectivamente.

Cuando se analiza el efecto del deshojado precoz sobre la concentración de los aminoácidos en las diferentes campañas se observan los siguientes resultados:

- En el año 2009 únicamente se observó un incremento ($p<0,05$) en los valores de Asp en las uvas ED vs C.
- En el 2010 no se hallaron diferencias significativas entre los valores de C y ED en ningún aminoácido, y únicamente se observó un descenso significativo del valor de Ethan en las uvas ED vs C.
- En la campaña 2011 se hallaron aumentos significativos ($p<0,05$) de los valores de Asp, Hypro y Pea y descensos ($p<0,05$) de los de la Asn, Gaba, Lys y Cys en las uvas C respecto de las ED.

El ratio Pro/Arg no se vio significativamente afectado por la práctica del deshojado precoz en ninguna de las campañas. Esta relación refleja la proporción de nitrógeno no asimilable, proporcionado mayoritariamente por la Pro, con respecto al nitrógeno asimilable, generalmente suministrado en una alta proporción por la Arg. Por tanto, el valor de este índice proporciona una información útil del contenido de sustancias nutritivas de un mosto para las levaduras, de modo que, para un determinado valor de FAN, un menor valor del ratio Pro/Arg favorecerá el desarrollo de la población de levaduras durante la fermentación (Bell y Henschke, 2005). Además, el valor de este ratio se ha empleado para clasificar las variedades de uvas en función de su capacidad de acumular uno u otro de estos dos aminoácidos (Stines et al., 2000; Garde Cerdán et al., 2009). Los valores medios de este ratio (0,98, 0,88 y 1,23 en 2009, 2010 y 2011 respectivamente) encontrados en este trabajo son próximos a los hallados por Hernández-Orte et al. (1999) en el estudio anteriormente citado.

En el estudio anteriormente citado, Pascual et al. (2015) observaron en las uvas procedentes de cepas sometidas a un tratamiento de deshojado practicado en enero, respecto de las procedentes de las cepas control, una tendencia a la disminución de la concentración de aminoácidos.

Kliewer y Ough (1970) encontraron regresiones significativas y positivas entre las concentraciones de Arg y Pro y el área foliar total de las cepas e indicaron que la síntesis de aminoácidos está positivamente correlacionada con la superficie foliar disponible. Los trabajos posteriores de Lam et al., (1996) y Forde y Lea (2007) han mostrado que las

hojas son el principal lugar de la asimilación de nitrógeno, en un proceso impulsado por la luz que implica la vía glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT). Por tanto, el descenso de AFT_m observado en las cepas a las que se aplicó el deshojado precoz en 2009 y 2011, podría ser, entre otras, una de las causas de la tendencia al descenso de concentración observado en las uvas ED, respecto de las C en la mayoría de los aminoácidos analizados en esas dos campañas. Por otra parte, la tendencia a la disminución de aminoácidos hallada en esas campañas también puede ser explicada en base a los trabajos de [Friedel et al. \(2015\)](#), quienes demostraron que un deshojado severo en las etapas tempranas del desarrollo de las bayas de la variedad Riesling (2 semanas tras floración), aumentaba la absorción de luz e incrementaba el porcentaje de radiación UV-B que llegaba a las uvas, provocando en éstas una tendencia generalizada al descenso del contenido de aminoácidos respecto a las uvas control, aunque únicamente encontraron diferencias significativas en algunos de los aminoácidos analizados (Thr, Glu y Arg).

El deshojado precoz modificó significativamente los valores medios trianuales (2009-2011) de 12 de los 28 aminoácidos analizados en las uvas. Respecto de los valores hallados en las uvas C, en las ED se hallaron aumentos del Asp (71,3 %), aminoácido incluido en el PAN, y de Hypro (72,3 %) y Pea (106,0 %) y disminuciones en 9 de ellos: Ala (13,7 %), Asn (32,6 %), Ethan (15,6 %), Gaba (32,9 %), Gly, (31,0 %), Lys (50,0 %), Phser (45,0 %), Sarc (24,8 %) y Cys (80,0 %). También se observó una tendencia al descenso de los valores de la Arg, Cit, His, Iso, Orn, Phe, Phser, Pro, Thr, Trp y Val en las uvas ED respecto de las C. Otros, como la Tyr y el Trp no se vieron afectados significativamente por el deshojado precoz. Este resultado es importante, ya que *Saccharomyces cerevisiae* puede utilizar estos dos últimos como fuente de nitrógeno convirtiéndolo en tirosol, hidroxitirosol o triptófol como los principales productos de su catabolismo ([Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2008](#)). Estas sustancias son de interés farmacéutico, ya que presentan diversas actividades beneficiosas para la salud, derivadas de sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, cardiopreventivas y antimicrobianas ([Bordiga et al., 2016](#)). Por lo tanto, el deshojado precoz no disminuiría significativamente las potenciales propiedades beneficiosas de los vinos resultantes.

El efecto año originó más diferencias en la concentración de los aminoácidos presentes en las uvas que la práctica del deshojado precoz. De hecho, se hallaron diferencias

significativas entre los valores medios anuales de todos ellos excepto de la Cys, Met y Orn.

Por lo general, los valores medios anuales más pequeños del trienio analizado se hallaron en 2010 y los más altos en 2011. Para explicar estos resultados hay que considerar que el mayor volumen de precipitaciones registrado durante el periodo de pre-verno (abril-junio) en el 2011 (Tabla 3.2, epígrafe 3.1.2) favoreció un mayor desarrollo del área foliar en ambos tratamientos (Tabla 4.2), en consecuencia, las cepas habrían sido fotosintéticamente más activas y se habría incrementado la síntesis de sustancias precursoras, como pueden ser la ribosa-5-fosfato y la eritrosa-5-fosfato (Hunter y Ruffner, 1997). El efecto del factor campaña ya ha sido mostrado en estudios previos realizados en la variedad Tempranillo cultivadas en Somontano (Hernández Orte et al., 1999) y La Rioja (Pérez-Álvarez et al., 2017). Garde-Cerdán et al. (2014) también observaron cierta relación entre las precipitaciones registradas y la concentración de aminoácidos de las uvas de las variedades Merlot, Monastrell, Shiraz, Petit Verdot cultivadas en Jumilla.

A pesar de los cambios anuales comentados, tanto en las uvas ED como en las C, la contribución de cada aminoácido al FAN fue similar en los tres años analizados. En el 2009, 2010 y 2011 estas contribuciones (valores medios de los tratamientos C y ED) fueron fueron del 31,8 %; 34,5 % y 30,5 % en el caso de la Arg; en el de la Thr, el 2,0 %, 1,6 %, y 1,7 %; en el de Gaba 4,7 %, 4,1 % y 3,7 %; las de Leu fueron del 0,5 % en 2009 y 2010 y 0,4 % en 2011. En consecuencia, el perfil aminoacídico de las uvas de ambos tratamientos experimentales fue similar durante los tres años analizados. Ya en 1991, Huang y Ough (1991) mostraron que, aunque las concentraciones individualizadas de los distintos aminoácidos, para una variedad y localización determinada, eran diferentes de una campaña a otra, el perfil de aminoácidos se mantenía similar durante todos los años.

4.2.3. Relación entre el contenido nitrogenado de las uvas y los parámetros agronómicos del cv. Tempranillo

Con el objetivo de analizar las relaciones entre los parámetros agronómicos (componentes de la producción), los relativos al crecimiento vegetativo de las cepas (AFT_m y AFT_m/P) y los contenidos de sustancias nitrogenadas (familias aminoácidas e índices nitrogenados) de las uvas se sometieron a un análisis de correlación los valores obtenidos en las correspondientes fechas de la vendimia C y la vendimia ED de los tres años del ensayo en las diferentes parcelas elementales.

Los valores de los coeficientes de correlación lineal de Pearson (r) para cada par de parámetros se muestran en la Tabla 4.7. Los resultados indican que, tanto el AFT_m como el ratio AFT_m/P están correlacionados con los contenidos de sustancias nitrogenadas presentes en las uvas cv. Tempranillo en las condiciones de cultivo de este ensayo en el momento de vendimia (23-24 °Brix). Se hallaron correlaciones lineales significativas ($p < 0,05$) y positivas entre AFT_m y α -cetoglutarato ($r = 0,82$), piruvato ($r = 0,87$), 3-fosfoglicerato ($r = 0,85$), FAN ($r = 0,84$), AAA-N ($r = 0,85$), YAN ($r = 0,85$) y TAS ($r = 0,88$); también se hallaron relaciones de este tipo entre el ratio AFT_m/P y α -cetoglutarato ($r = 0,82$) y piruvato ($r = 0,83$), FAN ($r = 0,81$), AAA-N ($r = 0,81$) y TAS ($r = 0,81$).

Tabla. 4.8. Coeficientes de correlación de Pearson (r) y significancia entre parámetros agronómicos y relativos al crecimiento vegetativo de las cepas y el contenido nitrogenado de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamientos control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED de las campañas 2009-2011.

Parámetro	α -cetoglutarato	Piruvato	Oxalacetato	Fosfoenopiruvato y Eritrosa-4-fosfato	3-Fosfoglicerato	Ribosa-5-Fosfato	FAN	AAA-N	YAN	AMM	TAS	PAN	AFT _m	Nº bayas/racimo	Producción	AFT _m /P
α -cetoglutarato	1															
Piruvato	0,99***	1														
Oxalacetato	0,97**	0,96**	1													
Fosfoenopiruvato	0,98***	0,96**	0,98***	1												
3-Fosfoglicerato	0,98***	0,99***	0,98***	0,98***	1											
Ribosa-5-Fosfato	1,00***	0,98***	0,97**	0,98***	0,97**	1										
FAN	1,00***	1,00***	0,97**	0,98***	0,99***	0,99***	1									
AAA-N	1,00***	1,00***	0,97**	0,98***	0,99***	0,99***	0,99***	1								
YAN	0,98***	0,98***	0,95**	0,97**	0,98***	0,96**	0,98***	0,98***	1							
AMM	-0,62	-0,57	-0,62	-0,61	-0,53	-0,67	-0,60	-0,59	-0,45	1						
TAS	0,90	0,92**	0,88*	0,83*	0,90*	0,88*	0,92**	0,91	0,85*	-0,65	1					
PAN	0,96**	0,94**	0,99***	0,99***	0,97**	0,97**	0,96**	0,96**	0,95**	-0,61	0,82*	1				
AFT _m	0,82*	0,87*	0,77	0,73	0,85*	0,76	0,84*	0,84*	0,85*	-0,23	0,88*	0,72	1			
Nº uvas/racimo	0,19	0,25	0,16	0,13	0,24	0,17	0,23	0,22	0,19	-0,03	0,36	0,07	0,32	1		
Producción	-0,11	-0,04	-0,07	-0,11	0,01	-0,15	-0,06	-0,07	-0,03	0,40	0,00	-0,14	0,11	0,86*	1	
AFT _m /P	0,82*	0,83*	0,75	0,74	0,78	0,8	0,81*	0,81*	0,80	-0,46	0,81*	0,74	0,85*	-0,14	-0,43	1

Nivel de significación: *, ** y *** indican significación a $p<0,05$, $p<0,01$ y $p<0,001$ respectivamente. FAN: Nitrógeno aminoacídico total; AAA-N: Nitrógeno aminoacídico asimilable; YAN: Nitrógeno asimilable por las levaduras; PAN Precusores aromáticos nitrogenados; TAS: Nitrógeno azufrado total; AMM: Amonio.

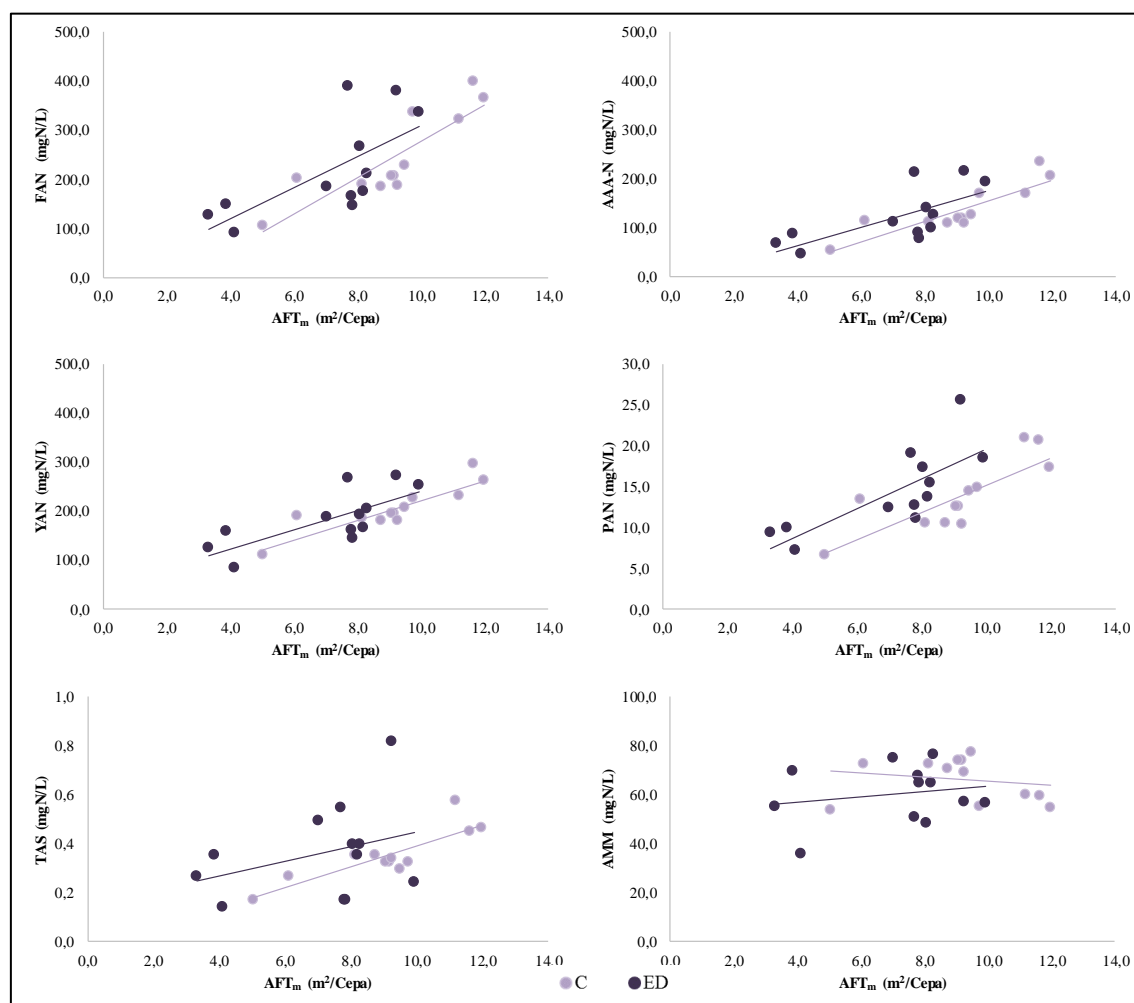
Posteriormente, se sometieron a análisis de regresión los valores de AFT_m y los de los índices FAN, AAA-N, YAN, PAN, TAS, AMM y los de las familias aminoacídicas. Se efectuó un análisis con los respectivos valores de cada tratamiento. Los resultados expuestos en la Tabla 4.9 y en las Figuras 4.13 y 4.14 demuestran la gran relación existente entre el contenido nitrogenado orgánico de las uvas y el área foliar desarrollada en la cepa, principalmente en el tratamiento control. Excepto para AMM, se obtuvieron relaciones lineales significativas que responden a la ecuación lineal del tipo $y=mx+b$ en ambos tratamientos. Los valores de m , y por tanto la amplitud de la respuesta del parámetro nitrogenado, varió en función del parámetro y del tratamiento considerado. En ambos tratamientos los mayores valores de m , se obtuvieron en FAN. Por otra parte, ante iguales variaciones de AFT_m, los cambios de valores de FAN, AAA-N, y α -cetoglutarato son netamente mayores en las uvas C que en las ED.

Tabla 4.9. Parámetros de las regresiones lineales entre AFT_m y el contenido nitrogenado de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).

Parámetro	Control (C)		Deshojado precoz (ED)	
	Ecuación modelo	R ²	Ecuación modelo	R ²
FAN	$y = 37,2x - 91,9$	0,74***	$y = 32,1x - 9,8$	0,47**
AAA-N	$y = 20,9x - 53,8$	0,75***	$y = 18,5x - 9,2$	0,49**
YAN	$y = 20,0x + 19,9$	0,78***	$y = 19,7x + 42,7$	0,54*
PAN	$y = 1,7x - 1,7$	0,65**	$y = 1,8x - 1,3$	0,58**
TAS	$y = 1,7x - 1,8$	0,65***	$y = 1,8x + 1,3$	0,59*
AMM	$y = -0,9x + 73,7$	0,04	$y = 1,1x + 51,8$	0,04
α -Cetoglutarato	$y = 28,8x - 80,7$	0,73***	$y = 26,3x - 23,5$	0,49**
Oxalacetato	$y = 2,0x - 6,7$	0,64**	$y = 1,7x - 0,6$	0,55**
Piruvato	$y = 1,8x - 1,4$	0,68**	$y = 1,6x - 1,9$	0,53**
Fosfoenolpiruvato	$y = 0,7x - 1,9$	0,68**	$y = 0,8x - 1,2$	0,58***
3-Fosfoglicerato	$y = 0,7x - 0,3$	0,65**	$y = 0,7x - 0,9$	0,63***
Ribosa-5-Fosfato	$y = 1,2x - 5,1$	0,72***	$y = 1,2x - 2,7$	0,47**

Nivel de significación: *, ** y *** indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente. FAN: Nitrógeno aminoacídico total; AAA-N: Nitrógeno aminoacídico asimilable; YAN: Nitrógeno asimilable por las levaduras; PAN: Precursores aromáticos nitrogenados; TAS: Nitrógeno azufrado total; AMM: Amonio.

En las Figuras 4.13 y 4.14 puede observarse que, con la excepción de AMM, para un mismo valor de AFT_m , el valor del correspondiente parámetro nitrogenado es siempre superior en el tratamiento ED. Ello puede ser debido a que, aunque sólo fue significativo en 2010, en todos los años del ensayo se observó la tendencia a un menor número de bayas/racimo en ED y por tanto la relación fuente/sumidero habría sido mayor en este tratamiento.



FAN: Nitrógeno aminoacídico total; AAA-N: Nitrógeno aminoacídico asimilable; YAN: Nitrógeno asimilable por las levaduras; PAN: Precusores aromáticos nitrogenados; TAS: Nitrógeno azufrado total; AMM: Amonio.

Figura 4.13. Representación gráfica de las relaciones lineales entre AFT_m y el contenido de FAN, AAA-N, YAN, PAN y AMM de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).

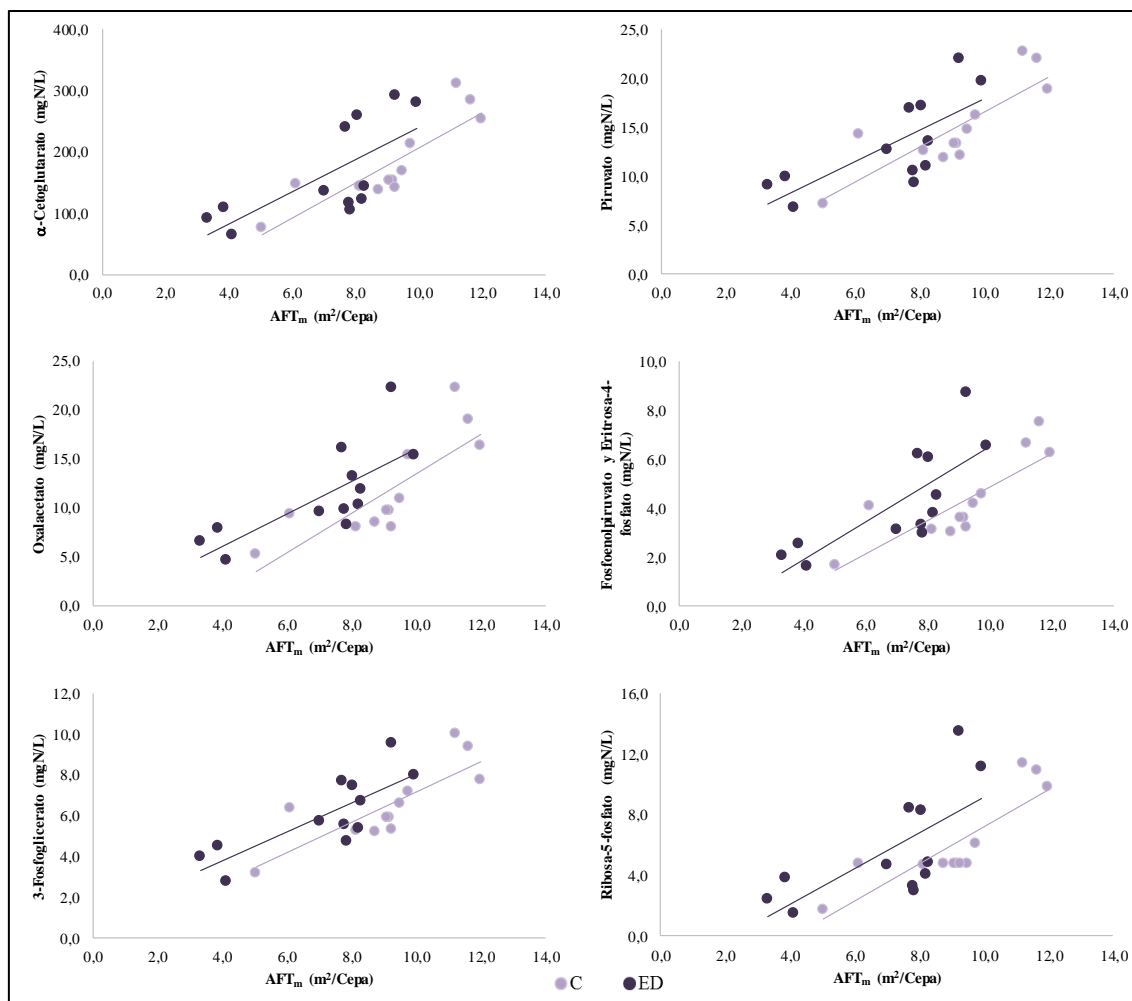


Figura 4.14. Representación gráfica de las relaciones lineales entre AFT_m y el contenido de las familias aminoacídicas de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).

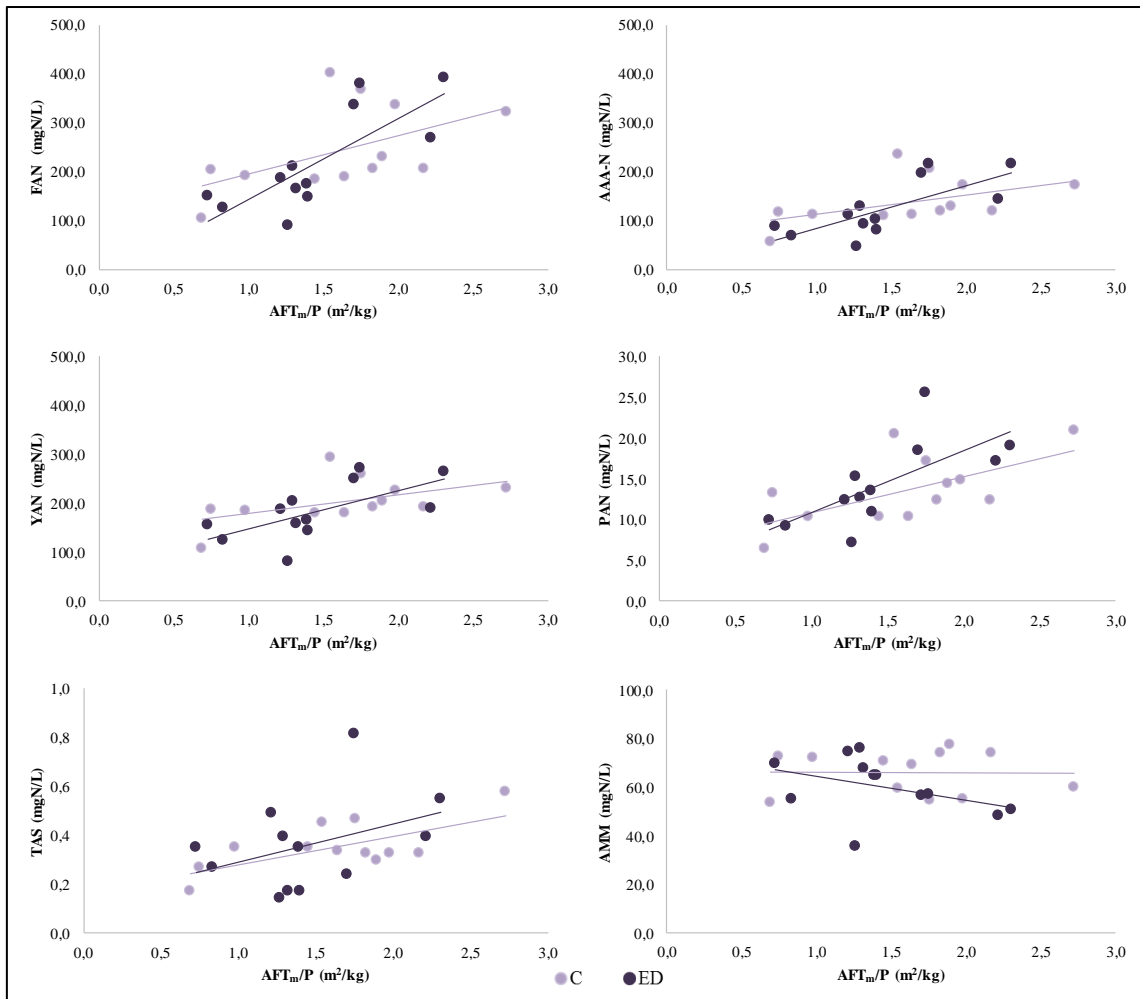
También se sometieron a análisis de regresión los valores del ratio AFT_m/P y los valores de los índices y familias nitrogenadas de cada tratamiento. La Tabla 4.10 y las Figuras 4.15 y 4.16 muestran los resultados de estos análisis. Los valores de R^2 presentaron siempre valores inferiores a 0,5 en C. La bajada de producción debida al ataque de *Botrytis cinerea* de la cosecha 2009, que alteró el ratio AFT_m/P , puede ser la causa de estos resultados. En lo que respecta a los resultados obtenidos en ED, los valores de las pendientes de las rectas calculadas fueron siempre mayores que los correspondientes hallados en el análisis de la regresión con el pármatero AFT_m . Ello indica la importancia del factor producción en el contenido nitrogenado de las bayas.

Tabla 4.10. Parámetros de las regresiones lineales entre AFT_m/P y el contenido nitrogenado de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).

Parámetro	Control (C)		Deshojado precoz (ED)	
	Ecuación	R^2	Ecuación	R^2
FAN	$y = 77,7x + 118,7$	0,27	$y = 165,4x - 22,1$	0,61***
AAA-N	$y = 38,9x + 73,6$	0,22	$y = 88,0x - 5,3$	0,54*
YAN	$y = 34,5x + 163,7$	0,24	$y = 81,7x + 82,8$	0,42*
PAN	$y = 4,4x + 6,5$	0,38*	$y = 7,6x + 3,3$	0,50*
TAS	$y = 4,4x + 6,5$	0,38*	$y = 7,6x + 3,3$	0,15
AMM	$y = -0,4x + 66,4$	0,00	$y = -10,1x + 74,7$	0,17
α -Cetoglutarato	$y = 74,7x + 61,7$	0,41*	$y = 131,7x - 27,6$	0,60***
Oxalacetato	$y = 5,8x + 2,5$	0,44*	$y = 6,9x + 1,3$	0,46*
Piruvato	$y = 4,5x + 7,6$	0,37*	$y = 6,9x + 3,2$	0,49*
Fosfoenolpiruvato	$y = 1,5x + 1,9$	0,27	$y = 3,4x - 0,6$	0,56***
3-Fosfoglicerato	$y = 2,0x + 3,2$	0,41*	$y = 2,9x + 1,9$	0,50*
Ribosa-5-Fosfato	$y = 2,8x + 1,6$	0,32	$y = 5,2x - 1,8$	0,44*

Nivel de significación: *, ** y *** indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente. FAN: Nitrógeno aminoacídico total; AAA-N: Nitrógeno aminoacídico asimilable; YAN: Nitrógeno asimilable por las levaduras; PAN: Precusores aromáticos nitrogenados; TAS: Nitrógeno azufrado total; AMM: Amonio.

Las Figuras 4.15 y 4.16 muestran que, aunque los valores de las pendientes de las correspondientes a ED son superiores en el caso del FAN, AAA-N, YAN y de las diferentes familias aminoacídicas (con la excepción de la oxalacetato). Por otra parte, a partir de un valor umbral se debe superar un cierto valor umbral del ratio AFT_m/P (1,5 m^2/kg) se obtiene, según las rectas, un mayor valor de estos índices en ED que en C.



FAN: Nitrógeno aminoacídico total; AAA-N: Nitrógeno aminoacídico asimilable; YAN: Nitrógeno asimilable por las levaduras; PAN: Precusores aromáticos nitrogenados; TAS: Nitrógeno azufrado total; AMM: Amonio.

Figura 4.15. Representación gráfica de las relaciones lineales entre AFT_m/P y el contenido de FAN, AAA-N, YAN, PAN y AMM de las uvas cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).

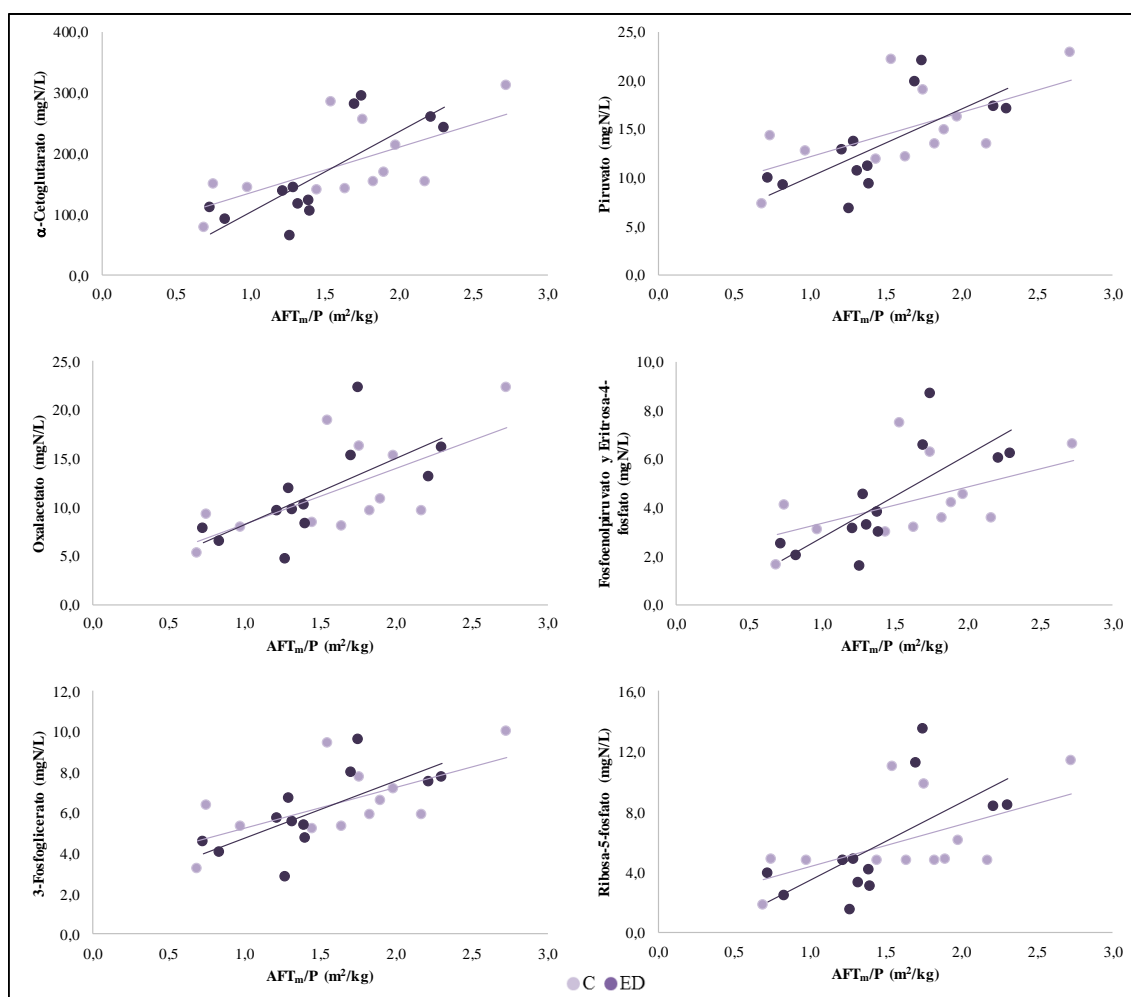


Figura 4.16. Representación gráfica de las relaciones lineales entre AFT_m/P y el contenido de las familias aminoacídicas de las uvas cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).

4.2.3.1. Análisis de componentes principales (ACP) de los parámetros agronómicos y del perfil aminoacídico de las bayas

Con el objeto de analizar conjuntamente los resultados de los tres años del estudio, los valores medios anuales de los componentes del rendimiento, desarrollo vegetativo, índices nitrogenados y familias aminoacídicas de las uvas C y ED hallados en las correspondientes fechas de vendimia se sometieron a un análisis de componentes principales.

La Figura 4.17 muestra el gráfico resultante de dicho análisis. Los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) explican el 90,8% de la varianza total, correspondiendo un 77,5 % al CP1 y un 13,2 % al CP2. El primer componente (CP1) queda caracterizado en su parte positiva por todas las familias aminoacídicas y los índices

nitrogenados, y en menor medida por el AFT_m . La Figura confirma la relación existente entre el AFT_m de las cepas y la composición nitrogenada de las uvas observada con anterioridad (Tabla 4.9). La parte positiva del CP2 está asociada a los componentes relacionados con el rendimiento de la cepa (la producción y el nº uvas/racimo) y el AMM, y en la parte negativa, el ratio AFT_m/P .

Las muestras se distribuyen en dos grupos, el primero de ellos, situado en el lado positivo del componente CP1, está formado por C-2011 y ED-2011. Las muestras de este año se separan del resto por el mayor contenido de sustancias aminoacídicas de las uvas y por los mayores valores de AFT_m y AFT_m/P de sus cepas. El segundo grupo está situado en el lado negativo del mismo componente y está formado por las muestras de los años 2009 y 2010. El componente CP2 permite diferenciar los tratamientos C y ED en función de los valores de la producción de las cepas y el número de bayas por racimo. La Figura 4.17 confirma que, en lo referente al contenido aminoacídico, la separación entre muestras estuvo más influenciada por el año que por el tratamiento vitícola aplicado. El contenido en sustancias nitrogenadas no permite diferenciar las muestras procedentes de los tratamientos C y ED en ninguna de las campañas analizadas.

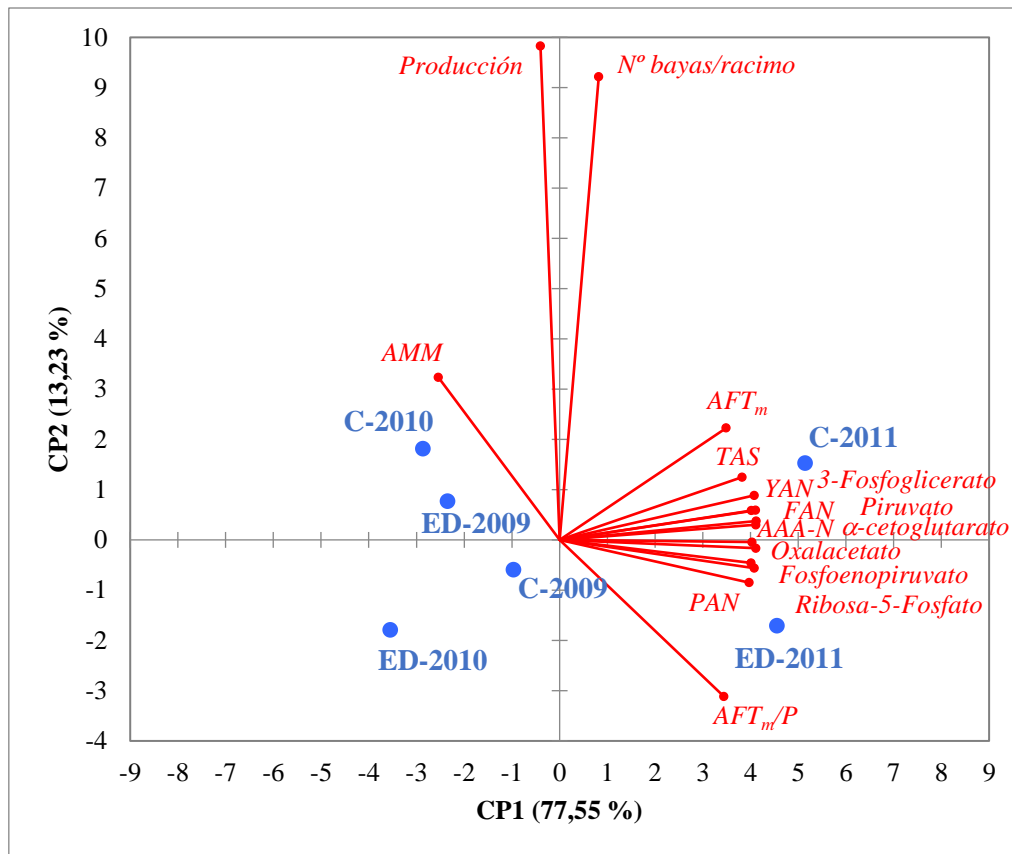
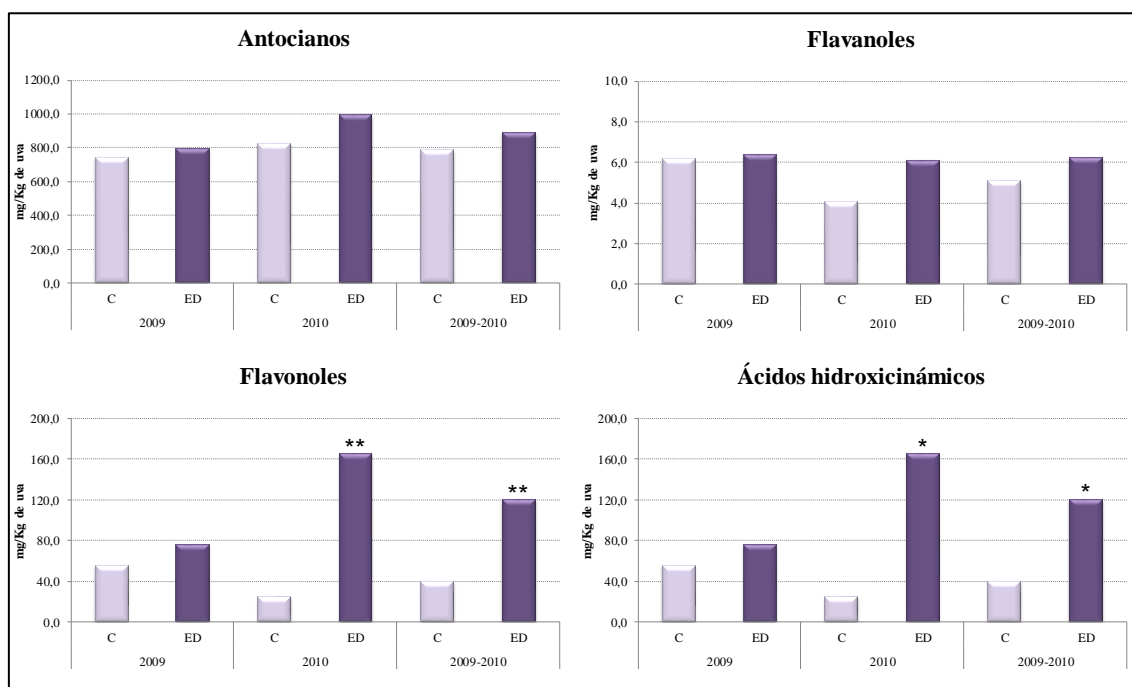


Figura 4.17. Análisis de componentes principales (ACP) aplicado a las familias aminoacídicas, índices nitrogenados y parámetros agronómicos de las uvas cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009-2011).

4.3. Influencia del deshojado precoz sobre composición fenólica total de hollejos de uva del cv. Tempranillo

En los hollejos de las bayas del cv. Tempranillo de ambos tratamientos se han identificado y cuantificado un total de 42 compuestos fenólicos pertenecientes a las siguientes familias fenólicas: antocianos, flavanoles (monómeros y dímeros), flavonoles y ácidos hidroxicinámicos (simples y conjugados).

La Figura 4.18 muestra los efectos del deshojado precoz sobre la concentración total de estas familias fenólicas en los hollejos de las uvas recogidas en las correspondientes fechas de Vendimia C y Vendimia ED de las campañas 2009 y 2010. Por tanto, se trata en todos los casos de uvas de similar contenido en SST (23-24 °Brix). En ambos años se observó en los hollejos de las bayas del tratamiento de deshojado precoz (ED) respecto al control (C), una tendencia al aumento de los valores de las concentraciones de esas familias, lo que provocó un aumento de la concentración total de compuestos fenólicos.



Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; ** y ***: indican significación a $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente.

Figura 4.18. Composición fenólica (mg/kg peso fresco de uva) de los hollejos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de Vendimia C y ED (campañas 2009 y 2010).

Smart y Robinson (1991) relacionaron el mayor contenido en sólidos solubles y polifenoles presentes en las uvas procedentes de cepas deshojadas, con una mayor exposición a la luz solar provocada por la eliminación de las hojas basales en la zona de los racimos. En el presente estudio, el incremento de sustancias fenólicas observado en los hollejos ED fue superior en la campaña 2010. En ese año, en ED, respecto de C, se registraron aumentos significativos de flavonoles (87,1 %) y de ácidos hidroxicinámicos (42,3 %). **Bavaresco et al. (2008)** hallaron que el efecto del deshojado aplicado en enero variaba en función de la interacción genotipo-ambiente: en años más fríos el deshojado mejoraba la maduración de las uvas Barbera y Malvasia, en tanto que, en condiciones más cálidas y secas, no se observaba ningún efecto. Sin embargo, en otras variedades como el cv. Croatina, se apreciaba el efecto opuesto. Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, el deshojado precoz no ejerció un efecto significativo sobre las concentraciones de compuestos fenólicos en el año más seco (2009, con valores más bajos de HI y CI) (Tabla 4.1, epígrafe 4.1.1), mientras que en el año de mayor volumen de precipitaciones (2010, con valores de HI y CI más altos) se observó un incremento en la concentración de los flavonoles y de los ácidos hidroxicinámicos y estilbenos.

4.3.1. Efecto del deshojado precoz sobre la concentración de antocianos de hollejos de la baya

La Tabla 4.11 muestra el efecto del deshojado precoz sobre los monoglucósidos, acetilglucósidos y cumarilglucósidos de cianidina, malvidina, petunidina, peonidina y delfinidina identificados y cuantificados en los hollejos de las uvas Tempranillo. El perfil antociánico observado es similar al hallado por **Revilla et al. (2009)** en diferentes clones de esta variedad. Según la bibliografía, los efectos del deshojado sobre la concentración de antocianos no siempre son concordantes. En el estudio de **Mazza et al. (1999)** la concentración de antocianos aumentó en las bayas de cepas deshojadas en floración del cv. Pinot Noir, mientras que el trabajo desarrollado por **Chortí et al. (2010)** no varió o aumentó en las de Merlot, Cabernet Franc y Nebbiolo.

Tabla 4.11. Concentración de antocianinas (mg/kg peso fresco de uva) en los hollejos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009 y 2010).

Compuesto (mg/kg)	2009		2010		Media	
	C	ED	C	ED	C	ED
Dp	83,5	85,6	68,2	113,0	75,9	99,1
Cy	15,6	9,6	8,6	9,6	12,1	9,6
Pt	79,9	84,5	71,2	104,6	75,5	94,6
Pn	25,8	17,9	24,3	18,6	25,1	18,3
Mv	279,1	303,9	306,8	363,4	293,0	336,0
Σ Monoglucósido	483,9	501,6	479,1	609,2	481,6	557,6
DpA	3,9	4,4	4,5	6,5	4,2	5,45*
CyA	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2	1,3
PtA	4,9	5,8*	6,4	8,5	5,7	7,2
PnA	0,8	0,8	0,9	1,2	0,9	0,9
MvA	23,7	28,6*	35,9	41,6	29,8	35,1
Σ Acetilglucósido	34,5	40,8*	48,9	59,1	41,8	50,0*
DpC	2,1	1,8	4,9	3,7	3,5	3,0
CyC	3,8	3,6	3,2	4,8	3,5	4,2
PtC	34,6	40,8*	42,4	54,2	38,5	47,5*
PnC	7,7	7,5	7,0	8,8	7,3	8,2
MvC	141,9	167,0	208,9	215,0	176,0	190,8
Σ Cumaroilglucósido	190,1	220,7*	266,4	286,5	228,8	253,7

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; *: indica significación a $p < 0,05$. Dp, delfinidina-3-glucósido; Cy, cianidina-3-glucósido; Pt, petunidina-3-glucósido; Pn, peonidina-3-glucósido; Mv, malvidina-3-glucósido; DpA, delfinidina-3-glucósido acetato; CyA, cianidina-3-glucósido acetato; PtA, petunidina-3-glucósido acetato; PnA, peonidina-3-glucósido acetato; MvA, malvidina-3-glucósido acetato; DpC, delfinidina-3-glucósido cumarato; CyC, cianidina-3-glucósido cumarato; PtC, petunidina-3-glucósido cumarato; PnC, peonidina-3-glucósido cumarato; MvC, malvidina-3-glucósido cumarato.

Los valores de la concentración de los acetyl y cumaroilglucósidos analizados fueron superiores en el año 2010 a las del 2009. Este hecho podría deberse a las diferencias de clima existentes entre ambas campañas. Estos resultados coinciden con los de otro trabajo que mostró que en años cálidos y soleados las concentraciones de antocianos fueron superiores a las de años fríos y lluviosos (Diago et al., 2012a).

Entre las formas monoglucósidas, la Mv seguido por la Dp fueron las predominantes, en tanto que la de Cy fue la menos abundante. En ninguno de los dos años el deshojado precoz tuvo efecto significativo sobre la concentración total de monoglucósidos (Σ Monoglucósidos), sin embargo, en los hollejos de las uvas ED respecto de los C se observó en ambos años un ligero aumento de los valores de Dp, Pt y Mv y una

disminución de Cy y Pn. Dicho resultado puede ser debido al aumento de la síntesis de antocianidinas trihidroxiladas (Dp, Pt y Mv) y la disminución en las formas dihidroxiladas (Cy y Pn) provocado por la mayor exposición de los racimos a la radiación ultravioleta en las cepas ED (Cortell y Kennedy, 2006). Resultados similares hallaron Sternad Lemut et al. (2013) en uvas del cv. Pinot Noir, aunque en dicho estudio no se observó una tendencia a la disminución de Cy.

La temperatura y la exposición al sol afectan a la síntesis de compuestos antociánicos. En zonas de climas fríos, en las que la temperatura del racimo es menor, los hollejos de las bayas procedentes de los racimos más expuestos a la luz solar suelen presentar mayores concentraciones de antocianos totales (Spayd et al., 2002); en las zonas de climas cálidos, una alta exposición a la luz puede provocar aumentos de las concentraciones de estas sustancias, pero si la temperatura de la baya es demasiado alta, puede afectar negativamente, disminuyendo la concentración de antocianos en los hollejos (Mori et al., 2007).

Con respecto a los acetilglucósidos, en los hollejos de las uvas ED, en comparación con C, en 2009 se hallaron aumentos significativos ($p<0,05$) y superiores al 15 % de PtA y MvA. En 2010 se observó la misma tendencia, aunque las diferencias no fueron significativas.

En relación a los compuestos cumaroilglucósidos, el deshojado precoz aumentó de forma significativa la acumulación PtC y del total de compuestos cumaroilglucósidos sólo en 2009.

Los compuestos de Mv y Pn son más estables que los de Dp, Cy, y Pt, pues al carecer de grupos hidroxilo en la posición orto, son más resistentes a la oxidación (He et al., 2010), siendo la malvidina la antocianidina más roja (Jackson, 2008). Por otro lado, los compuestos antociánicos en los que la molécula de azúcar está esterificada son más estables que las no esterificadas. En este trabajo, el deshojado precoz incrementó las formas acetiladas, aunque sólo significativamente en 2009. Este es un resultado interesante debido a que la acilación del azúcar en las antocianinas también puede favorecer su estabilidad química (Gueffroy et al., 1971).

4.3.2. Efecto del deshojado precoz sobre la concentración de flavanoles en hollejos de uva.

La Tabla 4.12 muestra que, independientemente del tratamiento y la campaña, los flavanoles predominantes fueron B1 y B3. En general, los hollejos de las uvas de los tratamientos ED presentaron concentraciones superiores de flavanoles, aunque el efecto no fue significativo ningún año. Al analizar el efecto del deshojado precoz sobre la acumulación de flavanoles en bayas del cv. Pinot Noir, [Sternad Lemut et al. \(2013\)](#) observaron, en las muestras correspondientes al inicio del ciclo, aumentos en las bayas procedentes de cepas deshojadas, sin embargo, las diferencias intertratamientos desaparecían en los muestreos de vendimia.

También se ha observado que la concentración de los flavanoles analizados difiere más entre las distintas campañas que entre los tratamientos experimentales aplicados. Estos resultados coinciden con otros estudios en los que los flavanoles de los hollejos de la uva no están influenciados por la exposición a la luz ([Downey et al., 2004](#)). Estos resultados difieren a los observados por otros autores, que observaron en uvas Tempranillo ([Diago, 2010](#)) y Pinot Noir ([Goldberg et al., 1998](#); [Kemp et al., 2011](#)), un aumento de la concentración de catequinas, que podría estar relacionada con una mayor exposición lumínica de los racimos que favorecería la síntesis de dichos compuestos mediante el aumento de la actividad de leucoantocianidina reductasa (LAR), la enzima relacionada con la síntesis de (+) - catequina ([Maugé et al., 2010](#)).

Tabla 4.12. Concentración de flavanoles (mg/kg peso fresco de uva) en los hollejos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009 y 2010).

Compuesto (mg/kg)	2009		2010		Media	
	C	ED	C	ED	C	ED
CA	3,0	2,6	1,2	1,3	1,8	1,9
EC	0,6	0,5	0,2	0,6	0,4	0,5
B1	6,2	6,5	2,5	4,8	4,4	5,6
B2	0,4	0,4	0,4	0,6	0,4	0,5
B3	1,0	1,0	3,3	4,7	2,1	2,9

CA, (+)-catequina; EC, (-)-epicatequina; B1, procianidina B1; B2, procianidina B2; B3, procianidina B3.

4.3.3. Efecto del deshojado precoz sobre la concentración de flavonoles en hollejos de uva.

La Tabla 4.13 muestra los 12 flavonoles identificados y cuantificados en los hollejos de bayas Tempranillo procedentes de los tratamientos C y ED. El perfil de flavonoles obtenido es similar al descrito para el cv. Tempranillo por [Hermosín-Gutiérrez et al. \(2011\)](#), en el que los derivados de quercetina y miricetina (MyG, QCG y QcGR) fueron los flavonoles mayoritarios. Al igual que observaron [Diago et al. \(2012a\)](#), el deshojado precoz incrementó, respecto del control, la concentración de estas sustancias en los hollejos de las uvas en los dos años en que se efectuó este estudio. Sin embargo, el efecto fue más significativo en 2010, en el cual, a excepción de las agliconas (formas no glicosiladas), se observaron en ED aumentos significativos en las concentraciones de todos los flavonoles en comparación con C.

Tabla 4.13. Concentración de flavonoles (mg/kg peso fresco de uva) en los hollejos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamientos control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009 y 2010).

Compuesto (mg/kg)	2009		2010		Media	
	C	ED	C	ED	C	ED
My	3,6	4,3*	2,6	4,4	3,1	4,3*
Qc	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
Kp	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
Ih	0,7	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
MyG	24,2	29,5	7,8	42,4***	16,0	36,0**
QcG	5,2	7,3	1,4	31,3*	3,3	19,3*
KpG	1,0	1,9	0,4	7,3*	0,7	4,6*
IhG	3,6	4,2	2,3	8,6***	3,0	6,4**
QcR	0,2	0,5	0,2	3,5*	0,2	2,0*
KpR	0,5	0,8	0,4	2,2*	0,4	1,5
QcGR	10,8	18,2*	5,4	49,5***	8,1	33,9**
QcGL	0,7	1,4	0,2	5,9*	0,5	3,7*

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; *, ** y ***: indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente. My, miricetina; Qc, quercetina; Kp, kaempferol; Ih, isorhamnetina; MyG, miricetina-3-glucósido; QcG, quercetina-3-glucósido; KpG, kaempferol-3-glucósido; IhG, isorhamnetina-3-glucósido; QcR, quercetina-3-rutinósido; KpR, kaempferol-3-rutinósido; QcGR, quercetina-3-glucurónido; QcGL, quercetina-3-galactósido.

En contraste con las síntesis de antocianos y taninos, que no se ve tan afectada por el sombreado, la ruta bioquímica que conduce a la formación de flavonoles es lumínico dependiente, favoreciendo su acumulación en las bayas como consecuencia de una mayor exposición a la radiación y al sol del viñedo (Spayd et al., 2002; Downey et al., 2004; Giovanelli y Brenna, 2007).

Los resultados expuestos en la Tabla 4.13 son interesantes, ya que estos compuestos están directamente involucrados en los procesos de copigmentación y estabilización del color en vinos tintos (Boulton, 2001; Spayd et al., 2002), cuya consecuencia más directa es un aumento de la intensidad de color de los vinos (Diago et al., 2012b). Varios estudios en soluciones modelo han demostrado que los flavonoles son las sustancias que mejor actúan como cofactores (Baranac et al., 1996), y de todos ellos, la quercetina el que mejor ejerce dicha función durante el proceso de copigmentación (Bakowska et al., 2003).

4.3.4. Concentraciones de ácidos hidroxicinámicos y estilbenos en hollejos de uva

La Tabla 4.14 muestra la influencia del deshojado precoz sobre la concentración de los ácidos hidroxicinámicos (CF, COU, y Fe), ácidos hidroxicinamoiltartáricos (Ca, Co, y Ft), y estilbenos (tR) en ambas campañas.

Tabla 4.14. Concentración de ácidos hidroxicinámicos y estilbenos (mg/kg peso fresco de uva) en los hollejos de las uvas del cv. Tempranillo procedentes del tratamientos control (C) y deshojado precoz (ED) en las correspondientes fechas de vendimia C y ED (campañas 2009 y 2010).

Compuesto (mg/L)	2009		2010		Media	
	C	ED	C	ED	C	ED
cCa	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1
tCa	3,3	3,7	2,3	3,9	2,8	3,8*
cCo	1,6	1,0	1,3	0,9	1,4	0,9
tCo	0,8	1,2**	0,5	1,7	0,7	1,4**
CF	12,1	13,1	12,2	14,8	12,1	14,0
COU	2,1	3,6*	9,3	9,2	5,7	6,4
cFt	6,2	7,4	3,3	15,4	4,7	11,4**
tFt	2,0	2,8	1,7	7,89	1,9	5,3*
Fe	0,5	0,9	2,3	1,9	1,4	1,4
tR	0,9	1,0	1,3	2,3	1,1	1,6

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; * y ** indican significación a $p<0,05$ y $p<0,01$ respectivamente. cCa, ácido c-caftárico; tCa, ácido t-caftárico; cCo, ácido c-cutárico; tCo, ácido t-cutárico; CF, ácido cafeico; COU, ácido cumárico; cFt, ácido c-fertárico; tFt, ácido t-fertárico; Fe, ácido ferúlico; tR, t-resveratrol.

La concentración total de ácidos fenólicos fue similar a la observada por otros autores en los hollejos de este cultivar, aunque se encontraron diferencias en las proporciones relativas de los ácidos individuales ([Gómez-Alonso et al., 2007](#), [Diago et al., 2012b](#)). El valor medio bianual de cuatro de estos compuestos (tCA, tCO cFT, y tFt) se incrementó significativamente en los hollejos ED respecto de los C. Cuando se observa el aumento de cada campaña, en 2009 el deshojado precoz incrementó significativamente tCo un 32,2 % y COU un 40,3 %, mientras que, en 2010, no se observaron diferencias significativas respecto al tratamiento control.

Los ácidos hidroxicinámicos e hidroxicinamoiltartáricos también pueden actuar como cofactores ([Markovic et al., 2000](#)). Estos ácidos reaccionan con los antocianos para formar piranoantocianos, que, al ser moléculas más estables, estabilizan el color del vino ([Schwarz et al., 2003](#)). Entre los ácidos fenólicos, [Markovic et al. \(2000\)](#) mostraron que el ácido ferúlico era el que provocaba el mayor aumento en la intensidad del color. [Bloonfield et al. \(2003\)](#) hallaron que la adición de los ácidos cafeico y *p*-cumárico a los mostos antes de la fermentación aumentaba la copigmentación intermolecular en el vino tinto resultante. Por lo tanto, es deseable el empleo de prácticas vitícolas que aumenten la concentración de los ácidos fenólicos en la baya. En este sentido el deshojado precoz resulta una práctica potencialmente útil. El incremento de estas sustancias observado en el presente trabajo puede ser explicado en base al aumento de la porosidad del dosel vegetal y a la mayor exposición de los racimos a la luz solar, así como a una mayor aireación de los mismos ([Tardáguila et al., 2010](#)).

Por otra parte, se debe prestar especial atención a la concentración de estos compuestos durante los procesos de vinificación y almacenamiento. Los vinos con altas concentraciones de ácidos hidroxicinámicos (especialmente *p*-cumárico y ácido ferúlico) en presencia de levaduras *Brettanomyces* pueden derivar en el desarrollo de fuertes olores fenólicos ([Steinke y Paulson 1964](#)). Por lo tanto, se deben tomar precauciones para evitar la acción dicho microorganismo.

4.4. Influencia del deshojado precoz en la composición y calidad de los vinos

4.4.1. Composición físico-química de los vinos

En la Tabla 4.15 se muestran los resultados del efecto del tratamiento de deshojado precoz sobre los parámetros generales analizados en los vinos de la variedad Tempranillo durante los años 2009-2011. El ANOVA reveló diferencias significativas en los valores medios interanuales del grado alcohólico, la acidez titulable (AT), el ácido málico (MH₂) y el ácido tartárico (TH₂) de los vinos procedentes de los tratamientos control (C) y deshojado precoz (ED). El efecto año fue significativo en todos los parámetros, con la excepción de AT y además se hallaron interacciones significativas Tr x Año para todos los parámetros excepto TH₂ y el potasio (K).

Al analizar de forma individual cada campaña, se hallaron los siguientes resultados:

- En la campaña 2009 se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) en los valores de pH, AT y TH₂. Respecto del vino control, el procedente del deshojado precoz presentó valores menores de pH y mayores de AT asociados a la mayor concentración de TH₂.
- En la campaña 2010, a diferencia de la anterior, la AT del vino ED fue menor que la del C ($p<0,01$), relacionada con la disminución significativa de la concentración de MH₂ ($p<0,001$) y con el aumento en la concentración de K ($p<0,05$) observada en esos vinos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por [Diago \(2010\)](#) quien, en su estudio, también observó que un deshojado manual más intenso (pre-floración-8 hojas) provocaba una disminución de la concentración de ácido málico en vinos de la variedad Tempranillo.
- En el 2011, el deshojado precoz provocó un incremento significativo del grado alcohólico ($p<0,01$), del pH ($p<0,05$) y de la AT ($p<0,05$) de los vinos.

Tabla 4.15. Composición físico-química de los vinos del cv. Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2009-2011).

Parámetro	2009		2010		2011		2009-2011		Significación		
	C	ED	C	ED	C	ED	C	ED	Tr	Año	Tr x Año
Grado alcohólico (% v/v)	13,2	13,4	13,5	14,1	12,0	13,6**	12,9	13,7	***	**	*
pH	3,8	3,7*	3,6	3,5	3,8	4,0*	3,7	3,7	ns	***	*
Acidez Titulable (AT, g TH ₂ /L)	5,6	6,3*	5,7	4,8**	6,9	4,7*	6,1	5,3	**	ns	**
Ácido málico (MH ₂ , g /L)	1,7	2,0	2,9	1,6***	2,0	2,1	2,2	1,9	***	**	***
Ácido tartárico (TH ₂ , g/L)	2,2	3,3**	3,0	3,2	3,0	3,1	2,7	3,2	**	**	ns
Potasio (K, g/L)	1,3	1,2	0,7	1,0*	1,8	1,8	1,3	1,3	ns	***	ns

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento × año); *, **, *** y ns: indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y no significativo respectivamente.

En lo que respecta al efecto del deshojado precoz sobre la composición físico-química de los vinos, **Kozina et al. (2008)** mostraron que dependía en gran medida de la variedad. Así, el deshojado provocaba en los vinos Sauvignon Blanc descensos de los ácidos tartárico y málico, mientras que en los elaborados a partir de uvas de la variedad Riesling, el deshojado únicamente incidía significativamente sobre el contenido del ácido tartárico respecto del vino control.

La Tabla 4.16 muestra los valores de los parámetros referentes a la composición fenólica y caracterización cromática de los vinos C y ED. En cuanto a los relativos a la composición fenólica (fenoles totales, antocianos totales y copigmentados, taninos y catequinas) la tendencia observada fue idéntica todos los años, y los valores hallados en los vinos ED fueron mayores que los C. En consecuencia, el deshojado precoz de las cepas provocó en los correspondientes vinos aumentos significativos de los valores medios trianuales de todos los parámetros relativos a la composición fenólica. Con la excepción de las catequinas y el porcentaje de color azul, el efecto año fue significativo para el resto de los parámetros mostrados en la Tabla. Además, se hallaron interacciones significativa Tr x Año en antocianos, intensidad de color y % azul.

Sternad Lemut et al. (2013) también observaron incrementos en la concentración de antocianos en los vinos del cv. Pinot Noir procedentes de uvas de cepas deshojadas, ya sea en prefloración, cuajado o envero. Por otra parte, es de destacar la tendencia al incremento del porcentaje de antocianos copigmentados en los vinos ED respecto a los vinos C, siendo este aumento significativo en las campañas 2010 y 2011. En el año 2010, la diferencia intertratamientos fue superior (63,4 %) a la obtenida en 2011 (23,5 %). Estos resultados están directamente relacionados con el incremento de flavonoles y ácidos hidroxicinámicos observado en los hollejos de las uvas del tratamiento ED vs C (Tablas 4.13 y 4.14) durante dicha campaña.

En lo que respecta a la incidencia del deshojado precoz en las características cromáticas de los vinos, los resultados obtenidos de la intensidad del color no son concluyentes, pues en el 2009 y 2010 no se observaron diferencias significativas entre los valores de ambos tratamientos, mientras que, en la última campaña, los vinos ED presentaron un mayor valor de intensidad de color en comparación con el control. La tonalidad de color de los vinos no se vio modificada significativamente por la aplicación

del deshojado precoz. En su trabajo, [Diago \(2010\)](#), no apreció diferencias en la tonalidad del color de los vinos de ambos tratamientos en ninguna de las campañas.

Sin embargo, en el 2010 el incremento del porcentaje de copigmentación, provocó un aumento del % de azul (efecto batocrómico) y de la intensidad del color (efecto hiperocrómico) ([Boulton, 2001](#)). Este resultado puede estar directamente relacionado con el mayor porcentaje de antocianos copigmentados, como resultado del mayor contenido de sustancias copigmentos (flavonoles y ácidos hidroxicinámicos) hallados en los hollejos de esas uvas en esa campaña.

En vista de estos resultados, podría concluirse que la composición fenólica de los vinos no refleja la composición de las uvas de partida, pues en ninguno de los años se encontraron diferencias significativas en el total de sustancias fenólicas de las uvas (Tabla 4.5) ni en la concentración de antocianos, ni flavanoles de los hollejos (Tablas 4.11 y 4.12) de las uvas vendimiadas. La explicación a estos hechos puede ser el diferente porcentaje de extracción de las sustancias fenólicas de los hollejos ED que de los C. Si se tiene en cuenta que el pH de los mostos fue similar, y por tanto no puede atribuirse a este factor, cabría pensar que, aunque las uvas de ambos tratamientos se vendimiaron con igual valor de SST, las uvas ED presentaban un estado de maduración fenólica más avanzado que las C, por tanto, la pared celular estaría más degradada, y el proceso de extracción estaría más favorecido lo que habría facilitado la difusión de las sustancias fenólicas existentes en el hollejo al mosto. La mayor concentración de taninos de los vinos ED avalaría esta idea. Además, el ligero aumento del grado alcohólico en los vinos ED respecto a C, también puede haber facilitado la extracción de los taninos presentes en las bayas ([Kemp et al., 2011](#)).

Tabla 4.16. Composición fenólica y cromática de los vinos del cv.Tempranillo (campañas 2009-2011) elaborados a partir de las uvas del tratamientos (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED).

Parámetro	2009		2010		2011		2009-2010		Significación		
	C	ED	C	ED	C	ED	C	ED	Tr	Año	Tr x Año
Fenoles totales (mg/L)	849,4	1039,6*	955,9	1537,2*	901,6	1289,6*	902,3	1288,8	***	**	ns
Antocianos (mg/L)	335,4	456,4***	389,2	633,5**	212,3	514,4**	312,3	534,8	***	***	**
Ant. Copigmentados. (%)	37,8	43,9	26,9	44,0**	16,4	20,7*	27,0	36,2	**	***	ns
Taninos (mg/L)	563,0	878,5*	1357,1	1878,0	1072,0	2046,1	997,4	1600,9	**	**	ns
Catequinas (mg/L)	1050, 6	1124,1	778,1	1403, 9*	959,4	1304,6*	868,8	1214,4	**	ns	ns
Intensidad de color	9,5	7,7	9,6	12,8	5,3	10,0**	8,1	10,2	**	**	**
Tonalidad de color	0,7	0,7	0,5	0,5	0,7	0,6	0,6	0,6	ns	**	ns
Rojo (%)	53,1	54,2	58,3	56,5	52,1	55,6	54,5	55,4	ns	**	ns
Azul (%)	11,5	10,9	10,7	12,4**	11,5	11,8	11,2	11,7	ns	ns	**
Amarillo (%)	35,4	34,9	31,0	31,2	36,4	32,6	34,3	32,9	**	**	ns

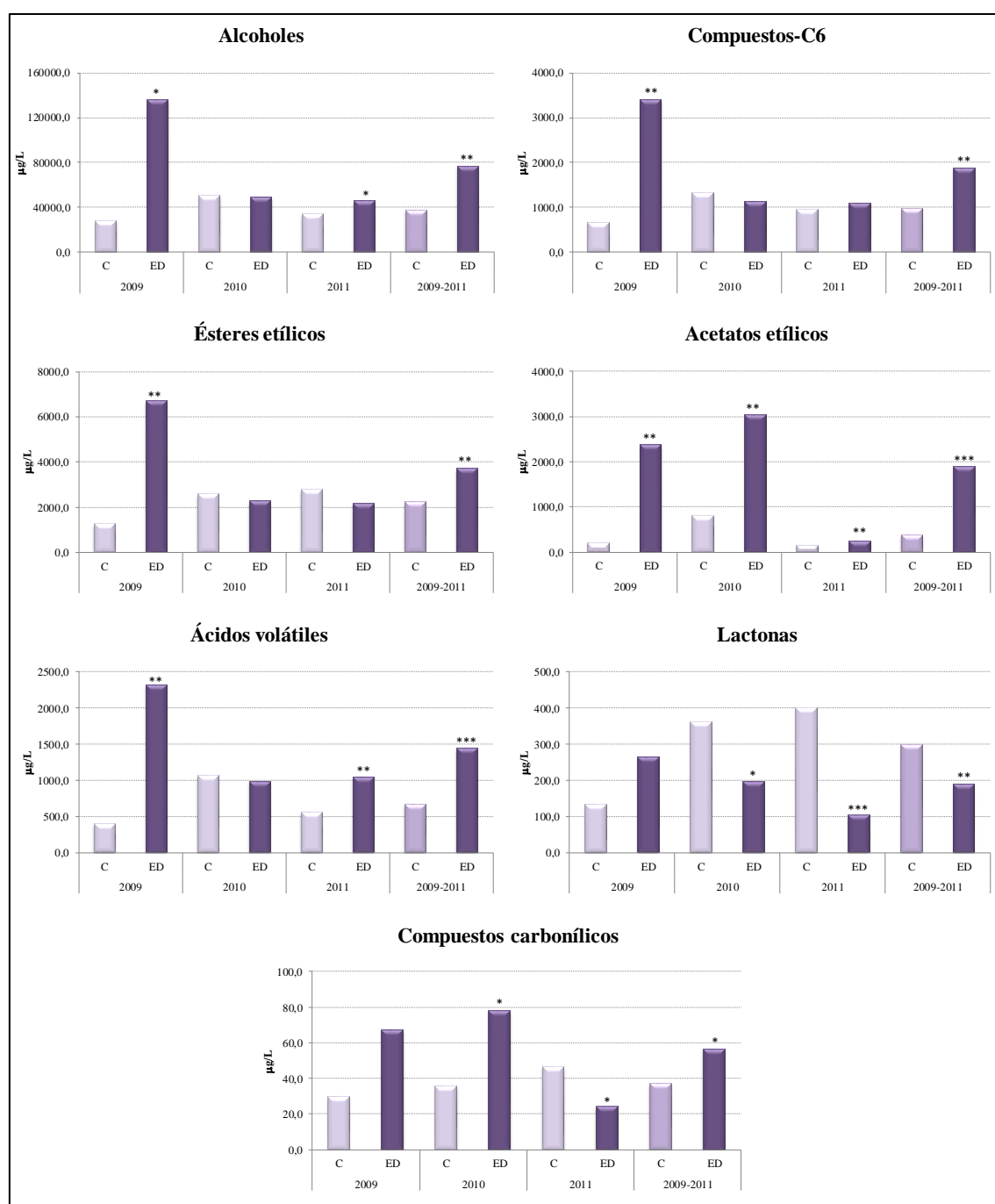
Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento × año); *, **, *** y ns: indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y no significativo respectivamente.

4.4.2. Efecto del deshojado precoz sobre la composición volátil de los vinos

La Figura 4.19 muestra el efecto del deshojado precoz sobre la composición volátil de los vinos Tempranillo procedentes de ambos tratamientos en las campañas 2009-2011. Los compuestos se agruparon en siete familias químicas (alcoholes, compuestos-C₆, ésteres etílicos, acetatos, ácidos volátiles, lactonas y compuestos carbonílicos). En la cosecha 2009, el deshojado precoz indujo cambios en la concentración de todas las familias de compuestos volátiles analizadas, con excepción de las lactonas y los compuestos carbonílicos. Sin embargo, en 2010, sólo se observaron cambios en los acetatos, lactonas y compuestos carbonílicos y en el 2011, esta práctica provocó variaciones en los contenidos de alcoholes, acetatos, ácidos volátiles, lactonas y compuestos carbonílicos. Varios trabajos han mostrado un aumento de la concentración de compuestos volátiles de las uvas y vinos procedentes de cepas deshojadas. [Reynolds y Wardle \(1989a\)](#) concluyeron que la eliminación de hojas basales aumentaba la concentración de los compuestos volátiles libres en vinos de la variedad Gewürztraminer.

En el presente estudio, el efecto del deshojado precoz afectó de manera diferente a las distintas familias de los compuestos estudiados. La concentración de la familia de los alcoholes, representados por 14 compuestos, mostró diferencias significativas en los vinos de los procedentes de los tratamientos ED y C de las campañas 2009 y 2011, siendo superior en los tratamientos ED. El deshojado precoz provocó un aumento significativo de la familia de compuestos-C₆, en la campaña 2009, pero no mostró ningún efecto en las campañas posteriores (2010 y 2011). En este sentido, [Vilanova et al. \(2012c\)](#) mostraron que el deshojado precoz provocaba una reducción significativa de los compuestos-C₆ en los vinos elaborados con la variedad Tempranillo cultivada en La Rioja.

El deshojado precoz indujo un aumento de la concentración de los ésteres etílicos presentes en los vinos, respecto de los vinos control en la campaña 2009 y también provocó un incremento de los acetatos totales en los vinos ED de todas las campañas en estudio y de los ácidos volátiles totales solamente en 2009 y 2011. [Vilanova et al. \(2012c\)](#) también observaron un aumento de la concentración de acetatos en los vinos elaborados a partir de uvas procedentes de cepas deshojadas.



Significación	Alcoholes	Compuestos C6	Ésteres etílicos	Acetatos etílicos	Ácidos volátiles	Lactonas	Compuestos carbonílicos
Tr	**	**	**	***	***	**	*
Año	**	**	**	***	*	*	*
Tr x Año	**	***	***	**	**	***	**

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento × año); *, **, *** y ns: indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y no significativo respectivamente.

Figura 4.19. Composición volátil (µg/L) de los vinos del cv. Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2009-2011).

Respecto a las lactonas, representadas por un único compuesto (butirolactona), no se observaron diferencias entre los vinos C y ED en la cosecha 2009, sin embargo, en las cosechas 2010 y 2011 se observó una disminución de su concentración en los vinos procedentes de las cepas deshojadas. Finalmente, los compuestos carbonílicos mostraron un comportamiento diferente en función de la campaña considerada, pues el tratamiento de deshojado precoz indujo un incremento en los vinos 2010 y una disminución de su concentración en los vinos 2011.

Un estudio desarrollado por [Bubola et al. \(2009\)](#) con la variedad Istrian Malvasia, el mostró que el deshojado en pre-floración daba lugar a vinos con concentraciones superiores de ésteres etílicos y alcoholes superiores en comparación con los vinos de cepas control. Sin embargo, cuando el deshojado se realizaba en enero se observó una disminución del contenido de estos compuestos. Los trabajos de [Verzena et al. \(2016\)](#) han mostrado que la eliminación temprana de las hojas puede aplicarse para mejorar la calidad del vino (compuestos volátiles) en la región Mediterránea.

Las diferencias observadas en la composición volátil de los vinos procedentes de los tratamientos C y ED en los distintos años de estudio, podrían deberse al hecho de que la fecha de la vendimia fue diferente (con el mismo contenido en sólidos solubles). Las diferentes fechas podrían haber afectado al metabolismo secundario de la baya, aunque estas mostraran similar valor de SST. [Vilanova et al. \(2012b\)](#) observaron que la evolución de compuestos volátiles durante la maduración de la uva no era proporcional a los cambios en el contenido de azúcar cuando estudiaban la maduración de diferentes variedades cultivadas en Galicia. [Torchio et al. \(2016\)](#) utilizaron la metodología de superficie de respuesta para evaluar el efecto simultáneo del momento de muestreo y del contenido de SST de las bayas sobre la composición volátil del cv. Moscato Bianco. Los resultados de dicho estudio mostraron que algunos compuestos estaban más influenciados por la fecha de muestreo que por la concentración de SST de las bayas y concluyeron que la estrategia de muestreo tenía un gran impacto sobre la calidad del aroma de las bayas, afectando de diferente manera a las distintas familias de compuestos volátiles.

El efecto del deshojado puede estar influenciado por las condiciones climáticas anuales ([Bavaresco et al., 2008](#)). En el presente estudio, los compuestos volátiles podrían haberse visto afectados por el deshojado precoz de una manera diferente en función de las condiciones meteorológicas de cada campaña. En la Tabla 3.2 (epígrafe 3.1.2) se mostró

que la integral térmica eficaz era ligeramente menor en 2009 que en las siguientes campañas (2037,6 °C, 2126,0 °C y 2137,1 °C en 2009, 2010 y 2011 respectivamente). Las diferentes condiciones climáticas anuales provocaron que el periodo de tiempo transcurrido desde enero al momento de la vendimia de los tratamientos ED fuera más corto durante el año 2011 (27 días), mientras que el año 2010 dicho periodo fue mayor (41 días).

La Tabla 4.17 muestra la influencia del deshojado precoz sobre la concentración (expresada en µg/L) de los compuestos volátiles individuales cuantificados en los vinos del cv. Tempranillo en las campañas 2009-2011. En esta tabla también se incluyó un análisis de la varianza para el factor tratamiento, el factor año, así como la interacción entre ambos. Las concentraciones de los compuestos identificados se muestran agrupados en las siete familias químicas ya citadas (alcoholes, compuestos-C₆, ésteres etílicos, acetatos, ácidos volátiles, lactonas y compuestos carbonílicos). Los resultados del ANOVA realizado muestran que el deshojado precoz (ED) afectó significativamente al 72,5 % de los compuestos identificados y cuantificados en comparación con el vino control. El efecto del año fue ligeramente mayor que el efecto del tratamiento (26 compuestos, lo que supuso un 76,5 %). El impacto del deshojado precoz fue mayor en la cosecha 2009, alcanzándose la mayor concentración de compuestos volátiles totales. La interacción Tr x Año fue significativa para la concentración de todos los compuestos identificados y cuantificados en los vinos de la variedad Tempranillo, con la excepción del 1-butanol.

A nivel de compuestos volátiles individuales, el efecto del deshojado precoz fue diferente en los distintos años de estudio. En general, la mayor concentración de estos compuestos se encontró en los vinos ED de la cosecha 2009, en la que la intensidad de dicha práctica, respecto al área foliar total inicial (AFT_i), fue menor que 2010 y 2011, años en los que también se eliminaron las hojas de los brotes anticipados en las cepas deshojadas (ED).

Tabla 4.17. Compuestos volátiles de los vinos del cv.Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamientos (Tr) control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2009-2011).

Familia	Compuesto (µg/L)	2009		2010		2011		2009-2010		Significación		
		C	ED	C	ED	C	ED	C	ED	Tr	Año	Tr x Año
Alcoholes	1-propanol	683,2	1835,3*	914,5	822,1	760,7	812,2	786,1	1156,5	*	*	**
	2-metil-1-pentanona	64,0	209,4*	123,3	113,5	38,5	86,7*	75,3	136,5	**	**	**
	2-metil-1-pentanol	948,8	2669,0*	1984,9	1369,3	2082,3	1422,8*	1672,0	1820,4	ns	ns	**
	1-butanol	54,2	121,2	81,2	72,6	62,3	66,4	65,9	86,7	ns	ns	ns
	2+3-metil-1-butanol	15771,5	70646,8*	27453,4	27698,8	17483,9	25849,8*	20236,3	41398,5	**	**	**
	4-metil-1-pentanol	10,6	59,8*	26,9	22,2	16,4	22,6*	18,0	34,9	*	**	***
	3-metil-1-pentanol	18,9	208,1**	44,5	43,2	16,0	36,1**	26,5	95,8	***	***	***
	1-octen-3-ol	6,1	22,6**	21,4	15,2	19,5	13,0*	15,7	16,9	ns	ns	***
	1-heptanol	23,8	115,9**	33,3	25,1	60,8	21,5**	39,3	54,2	*	***	***
	3,3 butanodiol	230,5	590,0*	589,8	421,9*	404,6	310,4*	408,3	440,8	ns	*	**
	Alcohol bencílico	21,6	66,9**	33,0	18,3*	83,7	39,2**	46,1	41,5	ns	***	***
	2-feniletanol	10093,1	58987,2*	18576,2	17926,1	12840,6	16909,0*	13836,6	31274,1	***	***	***
	Metionol	40,0	40,5	88,4	57,4	35,7	66,4	54,7	54,8	ns	**	**
Compuestos-C ₆	1-Hexanol	566,8	2896,8**	1190,1	952,4	858,2	967,6	871,7	1605,6	**	**	***
	E-3-Hexenol	3,1	14,5**	24,6	5,5**	7,5	3,9*	11,7	8,0	**	***	***
	E-2-Hexenol	25,8	65,8*	8,2	5,1	12,7	5,5**	15,6	25,5	*	***	**
	Z-3-Hexenol	10,1	57,5*	7,2	31,9**	15,1	25,0**	10,8	38,1	***	*	*
	Z-2-Hexenol	46,5	356,5**	79,6	123,4	63,2	82,3*	63,1	187,4	***	**	***

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento × año); *, **, *** y ns: indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y no significativo respectivamente.

Tabla 4.17. Continuación.

Familia	Compuesto (µg/L)	2009		2010		2011		2009-2010		Significación		
		C	ED	C	ED	C	ED	C	ED	Tr	Año	Tr x Año
Acetatos etílicos	Acetato de 2-feniletilo	18,2	173,9**	60,2	243,9**	38,7	23,3**	39,0	147,0	***	***	***
	Acetato de isoamilo	180,5	2202,4**	731,9	2785,8**	119,0	230,9**	343,8	1739,7	***	***	***
Ésteres etílicos	Butanoato de etilo	247,6	829,2*	515,9	624,6	440,0	473,3	401,2	642,4	*	ns	*
	Hexanoato de etilo	115,2	1234,1**	311,2	324,8	146,3	428,5***	190,9	662,5	***	***	***
	Octanoato de etilo	13,1	281,8**	64,0	68,0	14,9	79,4***	30,7	143,1	***	***	***
	Succinato de etilo	740,2	3719,0**	1010,9	840,2	1793,3	878,0**	1181,5	1812,4	***	**	**
	Lactato de etilo	108,3	507,7*	586,1	374,0*	286,3	254,5	326,9	378,7	ns	**	***
	Dietil malato	28,5	108,0*	89,8	44,6*	98,3	24,9**	72,2	59,2	ns	ns	***
Ácidos volátiles	Ácido isobutírico	30,7	85,1*	70,5	68,1	68,1	62,8	56,4	72,0	ns	ns	*
	Ácido butírico	13,9	67,5*	31,2	24,8	15,1	24,2*	20,1	38,8	**	*	**
	Ácido 2-metil-butanoico	58,2	248,2*	108,5	118,4	98,5	109,1	88,4	158,6	**	ns	**
	Ácido hexanoico	153,1	1026,2**	393,9	369,4	193,4	379,4**	246,8	591,7	***	*	***
	Ácido octanoico	87,2	652,0**	328,0	287,9	103,8	375,4***	173,0	438,4	***	***	***
	Ácido hexadecanoico	40,9	234,3*	125,3	106,4	79,5	81,4	81,9	140,7	**	ns	**
Otros compuestos	Butirolactona	133,7	263,8	360,9	194,8*	400,4	103,9***	298,3	187,5	***	*	***
	Acetoína	29,5	67,1*	35,5	77,7	46,1	23,8*	37,0	56,2	**	*	**

Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; los datos de los tres años se sometieron a un ANOVA de dos vías (tratamiento × año); *, **, *** y ns: indican significación a $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y no significativo respectivamente.

Los alcoholes fue el grupo mayoritario de compuestos volátiles, representado por 14 compuestos identificados y cuantificados y más del 87 % de la concentración total de compuestos volátiles presentes en los vinos de los tratamientos de deshojado y control, seguido de los ésteres etílicos. Independientemente del tratamiento experimental, el alcohol isoamílico (2+3-metil-1-butanol) y el 2-feniletanol mostraron la mayor concentración en los vinos Tempranillo. El deshojado precoz dio lugar a vinos con mayor concentración de 2+3-metil-1-butanol respecto al control en todos los años de estudio, mientras que el 2-feniletanol mostro un incrementó en los vinos elaborados a partir de las cepas deshojadas (ED) únicamente en el año 2009, aunque para ambos compuestos se observó, tanto un efecto del tratamiento, como del año.

El deshojado precoz provocó un efecto significativo sobre 7 de los 13 alcoholes analizados frente al control, siendo la campaña 2009 la que mostró el mayor incremento (11 compuestos). Este comportamiento varió en las siguientes campañas 2010 y 2011, observándose interacción Tr x Año en todos los alcoholes con excepción de 1-butanol. [Zoecklein et al. \(1998\)](#) observaron que un deshojado realizado dos o tres semanas tras la floración, provocaba un aumento de 2-feniletanol y alcohol bencílico en vinos elaborados a partir de diferentes variedades de uva blanca. Los resultados de este trabajo son contrarios a los observados en vinos del cv. Tempranillo de La Rioja, en los que no se observaron diferencias significativas para estos alcoholes entre los tratamientos de deshojado y control ([Vilanova et al., 2012c](#)).

Los efectos del deshojado precoz se observaron mayoritariamente en los compuestos- C_6 , entre los que el 1-hexanol mostró la mayor concentración tanto en ED como en C. Todos los compuestos en C_6 identificados y cuantificados se vieron afectados por el tratamiento de deshojado precoz en comparación con el control, aunque el sentido del efecto varió en función de la campaña estudiada. Al analizar cada año de forma independiente se observa que en 2009 el deshojado precoz provocó un incremento de todos los compuestos- C_6 vs control. Sin embargo, en 2010 y 2011 las concentraciones de *E*-3-hexenol y *E*-2-hexenol disminuyeron en los vinos procedentes del deshojado precoz. Los alcoholes con seis átomos de carbono, hexenoles y hexanoles, pueden aportar matices vegetales y herbáceos al vino ([Vilanova et al., 2015](#)). En este sentido, se ha demostrado que un deshojado tardío resulta ser menos eficaz para reducir la intensidad de los aromas herbáceos de los vinos en comparación con un deshojado precoz ([Arnold y Bledsoe,](#)

1990; Tardáguila et al., 2008). En el presente estudio, el incremento de compuestos-C₆ en ED observado en el 2009 pudo ser debido a que el área foliar eliminada (AFE) ese año (36 %) fue menor que en las siguientes campañas 2010 y 2011 (50 % y 40 % respectivamente) (Tabla 4.2, epígrafe 4.1.2).

Respecto a la familia de los acetatos, los resultados de este trabajo son similares a los encontrados en los vinos de la variedad Tempranillo cultivada en la Rioja, donde se hallaron aumentos en la concentración de estos compuestos en los vinos procedentes del deshojado aplicado en pre-floración respecto de los vinos control (Vilanova et al., 2012c). En el presente trabajo, se hallaron incrementos de la concentración de acetato de isoamilo en los vinos procedentes del deshojado precoz respecto de los vinos control en todos los años de estudio. Bubola et al. (2009) hallaron resultados similares cuando compararon el efecto del deshojado aplicado en diferentes momentos del ciclo (pre-floración, post-floración y envero) sobre la composición aromática de vinos elaborados con el cv. Istrian Malvasia. En dicho estudio, las mayores concentraciones de acetato de isoamilo fueron encontradas en los vinos elaborados a partir de cepas deshojadas en pre-floración.

El deshojado precoz también mostró influencia del tratamiento sobre los ésteres etílicos y los ácidos grasos volátiles, puesto que modificó la concentración de la concentración de 9 de los 12 compuestos identificados (valor medio 2009-2011). En la campaña 2009, el deshojado precoz provocó un aumento de los ácidos grasos volátiles y ésteres etílicos. Sin embargo, este comportamiento no se halló durante las campañas 2010 y 2011. El succinato de etilo, principal éster etílico presente en los vinos del cv. Tempranillo, mostró un comportamiento opuesto en 2009 y 2011 y su concentración no se vio afectada por el deshojado en 2010.

Por otra parte, el deshojado precoz provocó la disminución de la butirolactona en los vinos del cv. Tempranillo en los años 2010 y 2011. Numerosos estudios han relacionado las lactonas con el aroma asociado con *Botrytis cinerea* en los vinos procedentes de Sauternes (Bailly et al., 2009), Barsac, Loupiac (Sarrazin et al., 2007), Campania (vinos dulces de Fiano) (Genovese et al., 2007) y Hungría (Tokaji Aszú) (Miklós y Kerényi, 2004). En el año 2009, la primera campaña en la que se realizó el deshojado, la uva estuvo muy afectada por *Botrytis cinerea*, sin embargo, los valores de la butirolactona en los

vinos no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, aunque se observó una tendencia a un mayor valor de este compuesto cuando se aplicó el tratamiento ED.

Otro compuesto volátil implicado en el aroma del vino es la acetoina, que suele estar en una concentración de 0 a 140 mg/L (Etiévant, 1991). A diferencia de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, las especies no *Saccharomyces* son grandes productores de acetoina (Romano y Suzzi, 1993; Romano et al., 2003). En el presente estudio se observó efectos del tratamiento, año y Tr x Año sobre la concentración de acetoina, en los vinos elaborados. Analizando los resultados obtenidos por campañas, se observó un aumento de la concentración de acetoina en 2009 cuando se aplicó el deshojado precoz, sin embargo, en 2011, el deshojado provocó una disminución de dicho compuesto. En 2010, el deshojado precoz no afectó a la concentración de acetoina.

Por otra parte, todos los compuestos volátiles analizados, con excepción del 1-butanol, mostraron una interacción significativa Tr x Año lo que explica que la cosecha ejerció una influencia sobre el efecto del tratamiento (Tabla 4.17). Este resultado podría explicarse por las condiciones climáticas y el ataque de *Botrytis cinerea* durante la campaña 2009.

4.4.2.1. Análisis de componentes principales (ACP) de la composición volátil de los vinos

Con el objetivo de representar gráficamente el efecto del deshojado precoz sobre la composición volátil de los vinos obtenidos en los tres años de estudio se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con los valores medios de la concentración de las familias de compuestos volátiles analizadas (Fig.4.20).

Los dos primeros componentes principales (CP) explicaron el 88,5 % de la varianza total, correspondiendo un 71,6 % al CP1 y un 16,9 % al CP2. El CP1 estuvo caracterizado por una mayor contribución de los compuestos carbonilados, ésteres, acetatos, compuestos C₆, ácidos volátiles y alcoholes en el lado positivo. El eje PC2 se caracterizó únicamente por la familia de las lactonas en el lado positivo.

El ACP mostró claramente tres grupos, un primer grupo situado en el lado positivo del CP1, y formado por los vinos de los tratamientos de deshojado precoz de las campañas de 2009 y 2010. Un segundo grupo formado por los vinos control de los años 2010 y

2011, situados en el lado positivo del componente CP2, y un tercer grupo formado por el vino control de la campaña 2009 y el deshojado precoz del año 2011 situados en el lado negativo de los componentes CP1 y CP2.

Se observaron mayores diferencias entre los tratamientos de la campaña 2009, (en este año el volumen de precipitaciones durante la etapa de pre-verano fue menor) en la que el vino del tratamiento de deshojado precoz mostró una mayor concentración de todas las familias de compuestos analizados, a excepción de las lactonas. En 2010 (116 mm de lluvia durante el período pre-verano), estas diferencias fueron menores, mientras que, en 2011, con más volumen de precipitación durante la etapa de pre-verano (122 mm) las diferencias entre tratamientos fueron debidas principalmente a la familia de lactonas.

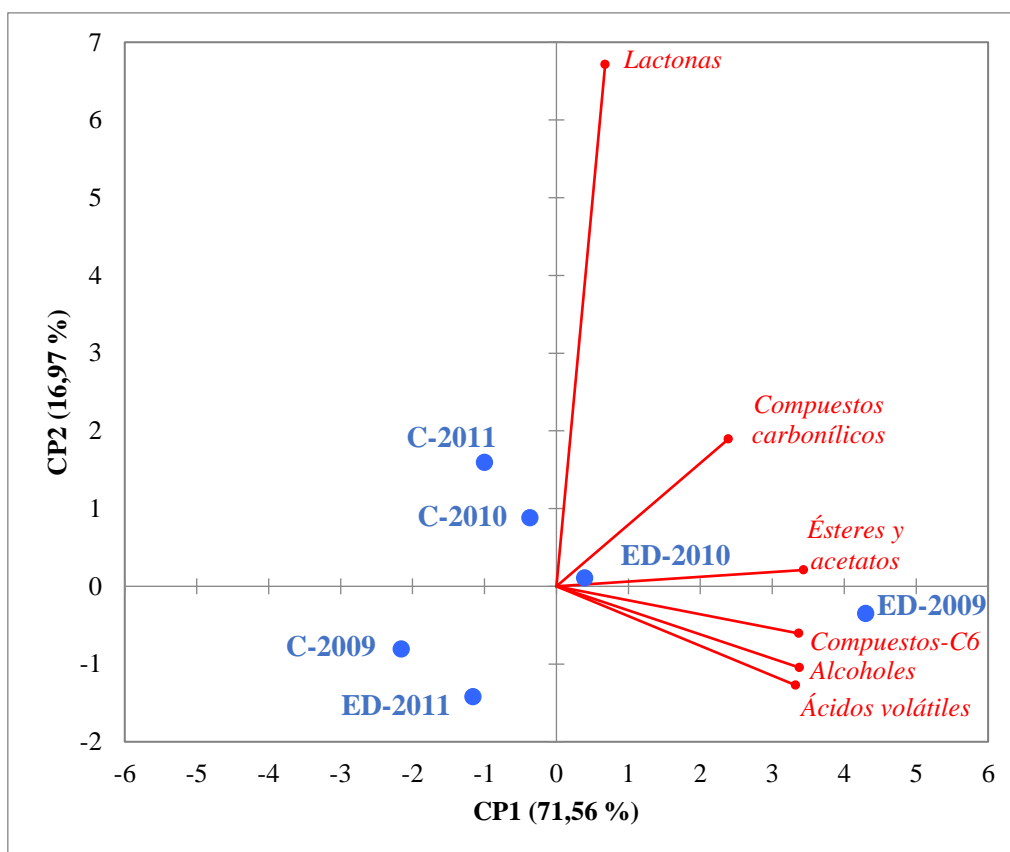


Figura 4.20 Análisis de componentes principales (ACP) aplicado a las familias de compuestos volátiles de los vinos del cv. Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2009-2011).

4.4.3. Valor de Actividad Odorífera de vinos Tempranillo procedentes de cepas control y deshojadas

Con el fin de conocer la influencia de los compuestos volátiles cuantificados sobre la percepción aromática de los vinos, se calculó el valor de actividad odorífera (VAO) sobre la media de las concentraciones obtenidas de las campañas 2009-2011. Los VAO se calcularon como la relación entre la concentración de cada compuesto y su umbral de percepción, utilizando los umbrales descritos en la bibliografía (Etiévant, 1991; Ferreira et al., 2000; Francis y Newton, 2005; Vilanova et al., 2009). Los resultados se muestran en la Tabla 4.18, en la que se puede observar que 9 de los 34 compuestos volátiles cuantificados en los vinos del cv. Tempranillo alcanzaron una concentración por encima del umbral de percepción ($VAO > 1$). Los vinos procedentes del tratamiento de deshojado precoz mostraron el mayor VAO para todos los compuestos volátiles con diferencias significativas entre los tratamientos C y ED, representando un total de 175,9 del VAO para ED vs 56,2 para C.

Tabla 4.18. Valores de Actividad Odorífera (VAO) en vinos del cv Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) (media de las campañas 2009-2011).

Compuestos ($\mu\text{g/L}$)	Umbral ($\mu\text{g/L}$)	Descriptor	C	ED
2+3 metil-1-butanol	30000	Alcohol, disolvente	0,7	1,4
2-feniletanol	14000	Rosa, miel	1,0	2,2
Octanoato de etilo	5	Manzana	6,1	28,6
Butanoato de etilo	20	Manzana	20,1	32,1
Hexanoato de etilo	14	Frutal, manzana	13,6	47,3
Acetato de isoamilo	30	Plátano	11,5	58,0
Ácido 2-metil-butanoico	33	Queso	2,7	4,8
Ácido hexanoico	420	Queso	0,6	1,4

Descriptores y umbrales aromáticos de compuestos volátiles encontrados en bibliografía (Etiévant, 1991; Ferreira et al., 2000; Francis y Newton, 2005; Vilanova et al., 2009).

En los vinos procedentes de cepas en las que se aplicó el deshojado precoz, los mayores VAO se registraron en el acetato de isoamilo (plátano), hexanoato de etilo (afrutado), butanoato de etilo y octanoato de etilo (aroma de manzana). Vilanova et al. (2012c) hallaron valores más altos para el VAO de octanoato de etilo en los vinos de Tempranillo elaborados a partir de tratamientos de deshojado manual en pre-floración. El análisis de VAO indicó que los compuestos que aportan aromas frutales se encontraron por encima de sus umbrales de percepción en los vinos del cv. Tempranillo procedentes de cepas a

las que se aplicó el deshojado precoz. Además, el aumento conjunto de octanoato de etilo, butanoato de etilo, hexanoato de etilo y acetato de isoamilo puede haber contribuido al aumento de aroma afrutado general en los vinos de dicho tratamiento. Todos los compuestos relacionados con los aromas herbáceos se encontraron por debajo de umbral de percepción en todos los vinos analizados. Resultados similares se observaron en los vinos Pinot Noir elaborados a partir de tratamientos de deshojado parcial de las cepas (Kemp et al., 2010).

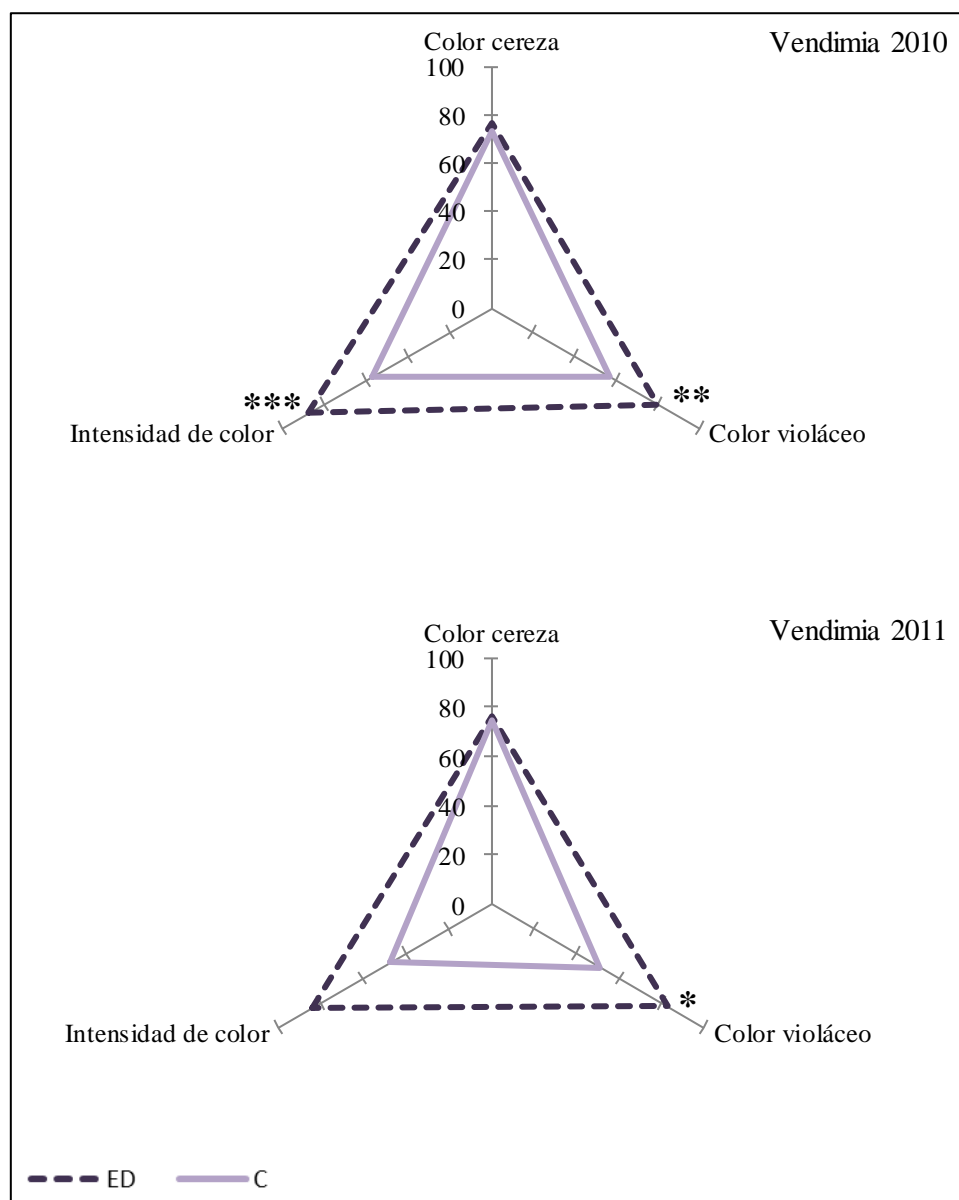
4.4.4. Influencia del deshojado precoz sobre las características sensoriales de los vinos

Con el fin de determinar la influencia del tratamiento de deshojado precoz sobre las características organolépticas de los vinos se llevó a cabo el análisis sensorial de los elaborados en las campañas 2010 y 2011, tras un periodo de 3 meses de permanencia en botella. El análisis se realizó mediante análisis sensorial descriptivo cuantitativo en fase visual, olfativa y gustativa. La interpretación de los resultados se realizó mediante comparación de datos medios aplicando el test “t” de Student.

En ambas campañas el deshojado precoz modificó el perfil visual, aromático y gustativo de los vinos, aunque con diferente grado de intensidad. Los valores de la intensidad de cada uno de los atributos y los resultados del test “t” de Student se muestran en las Figuras 4.21, 4.22 y 4.23 donde aparecen reflejados la intensidad de los descriptores del color, aroma y gusto respectivamente, que presentaron una media geométrica GM >10 % durante el proceso de generación y selección de descriptores (Gamero, 2015).

Según refleja la Figura 4.21, el vino ED elaborado en el año 2010 obtuvo en la fase visual valores significativamente más altos en los descriptores “color violáceo” ($p<0,01$) e “intensidad de color” ($p<0,001$) respecto del vino C. En la campaña 2011 se observó una tendencia similar a la de la campaña anterior, aunque únicamente se observaron diferencias significativas en el caso del descriptor “color violáceo”, siendo el vino ED el que presentó una mayor intensidad de dicho parámetro ($p<0,05$) en relación a los vinos C. Estos resultados confirman los obtenidos en el análisis de la composición físico-química (epígrafe 4.4.1), en el cual se observó en los vinos del tratamiento de deshojado una tendencia a presentar valores superiores del parámetro intensidad de color y del porcentaje de color azul, relacionado con el mayor grado de copigmentación. Estos

resultados concuerdan con los obtenidos por Verdenal et al. (2017), con cepas del cv. Pinot Noir durante las campañas 2010-2015. Dichos investigadores mostraron que los vinos procedentes de tratamientos de deshojado precoz presentaban una mayor intensidad de color en la fase visual.



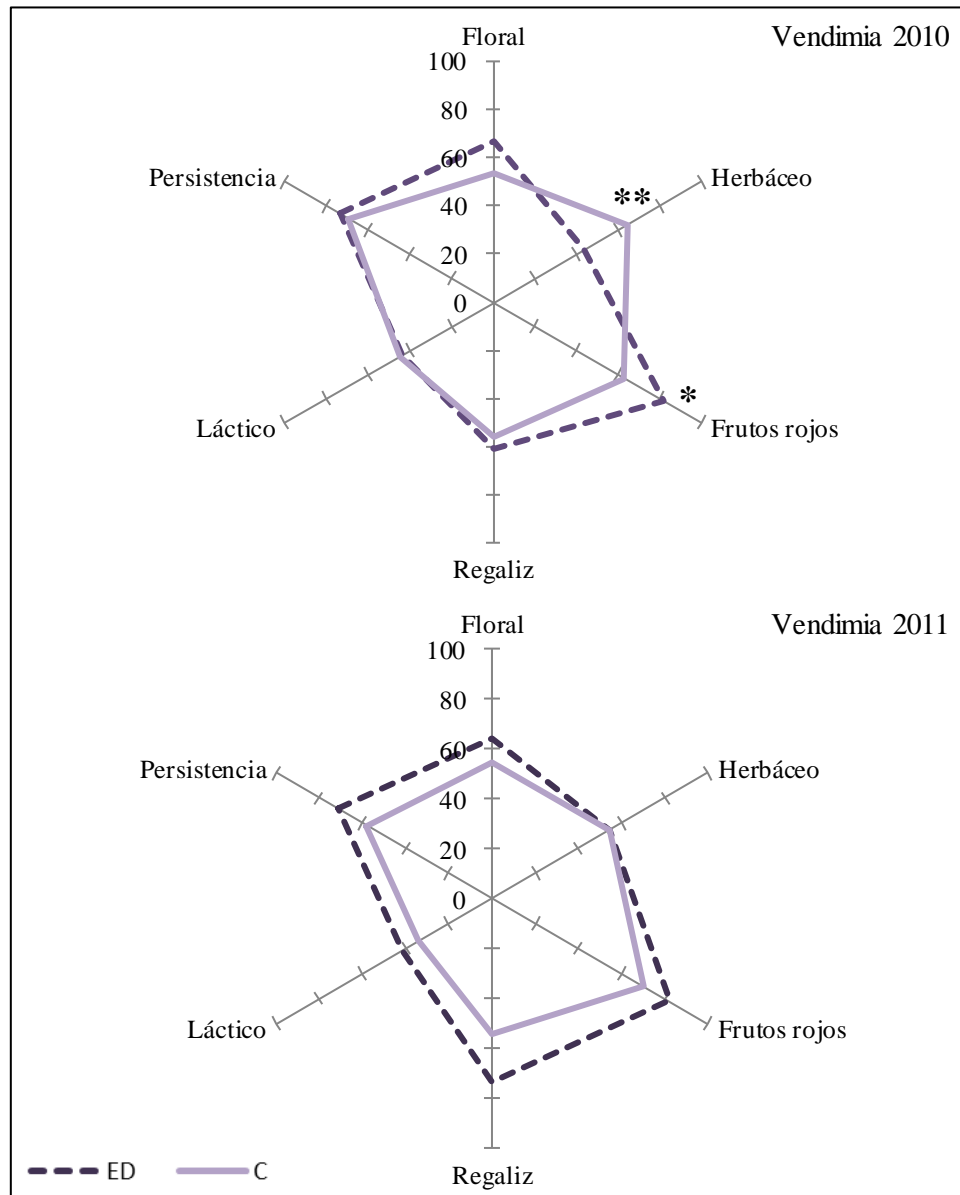
Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; * y **: indican significación a $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente.

Figura 4.21. Perfil sensorial visual de los vinos del cv. Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2010-2011).

La Figura 4.22 muestra los resultados obtenidos en la fase olfativa. En el 2010 frente al vino C, el ED obtuvo una puntuación superior en el descriptor “frutos rojos” ($p<0,05$) y menor en el “aroma herbáceo” ($p<0,01$). En el año 2011 se obtuvieron unos resultados similares a la campaña anterior y las diferencias siguieron la misma tendencia. Como se ha comentado anteriormente, en los vinos elaborados con uvas cosechadas a partir de cepas en las que se aplicó el tratamiento de deshojado precoz, también se hallaron mayores valores de actividad odorífera (VAO) de compuestos aromáticos relacionados con los aromas frutales y menores valores de VAO de los compuestos que pueden aportar matices vegetales y herbáceos al vino.

Estos resultados coinciden con los hallados por [Vilanova et al. \(2012c\)](#) en vinos Tempranillo de la Rioja y por [Verdenal et al. \(2017\)](#) en vinos del cv. Pinot Noir de Suiza. Ambos trabajos muestran que esta técnica produce en los vinos un incremento en la intensidad de atributos florales, y una disminución de los herbáceos. Por otro lado, en estudios en los que se aplicó un deshojado tardío, [Ristic et al. \(2013\)](#), sobre el perfil olfativo de vinos del cv. Chardonnay procedentes del sur de Australia y [Šuklje et al. \(2016a\)](#) en vinos del cv. Sauvignon Blanc de Sudáfrica, encontraron atributos frutales en los vinos procedentes de cepas deshojadas, mientras que los vinos control se caracterizaron por aromas herbáceos. Además, en otro trabajo realizado con diferentes clones del cv. Sauvignon Blanc de Sudáfrica, se mostró que el efecto del deshojado podría diferir en función del genotipo ([Šuklje et al., 2016b](#)). A este respecto, en un estudio realizado en diferentes cultivares blancos (Moscatel de Alejandría, Moscatel de Grano Menudo y Albillo Real) en la Comunidad de Madrid se observó que los parámetros sensoriales de los vinos del cv. Moscatel de Grano Menudo apenas se vieron afectados por la práctica de deshojado tras el envero durante ninguno de los años del estudio ([Crespo, 2017](#)). Por otra parte, también se ha mostrado que las condiciones climatológicas repercuten en la extensión y significancia del efecto del deshojado sobre los vinos. En ese sentido, [Diago et al. \(2010\)](#) encontraron una gran variedad interanual en sus resultados: el primer año, de aplicación de la técnica que fue cálido y seco, no observaron efecto del deshojado precoz sobre los atributos sensoriales del vino del cv. Tempranillo, mientras que el segundo año, más fresco y lluvioso, se obtuvieron vinos con más aromas florales y frutales en comparación con el control. [Crespo \(2017\)](#) también observó una variabilidad interanual en el efecto del deshojado tardío, pues durante el año más seco y caluroso, de forma general los vinos elaborados a partir de cepas deshojadas

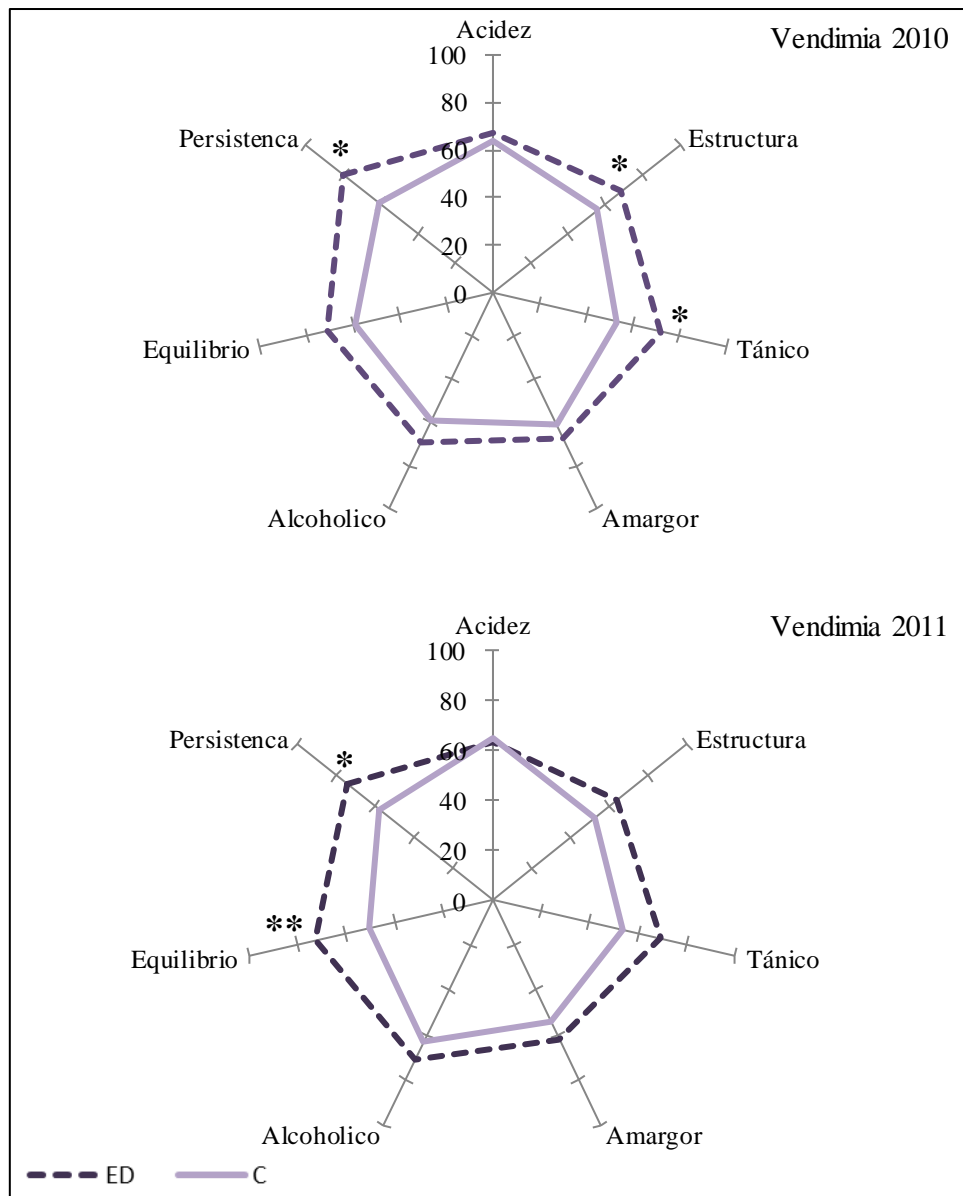
de los cv. Moscatel de Alejandría y Albillo Real obtuvieron, de manera general, una mejor valoración de la calidad e intensidad aromática global y de los aromas florales y, por el contrario, el año que presentó temperaturas más suaves y mayores precipitaciones, los atributos visuales y aromáticos de los vinos control fueron mejor valorados en comparación con los deshojados.



Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; * y **: indican significación a $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente.

Figura 4.22. Perfil sensorial olfativo de los vinos del cv. Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2010-2011).

La Figura 4.23 muestra los resultados de la fase gustativa. El deshojado precoz provocó un aumento significativo en las puntuaciones de los parámetros “estructura” ($p<0,05$), “tánico” ($p<0,05$) y “persistencia” ($p<0,05$) de los vinos de la cosecha 2010 y de “persistencia” ($p<0,05$) y “equilibrio” ($p<0,01$) en 2011 (Fig. 4.23b). Los vinos procedentes de cepas en las que se aplicó el tratamiento de deshojado precoz fueron descritos por los catadores como vinos más equilibrados y con mayor estructura en boca. Estos resultados están relacionados con la composición físico-química de los vinos (epígrafe 4.4.1), ya que los vinos procedentes del tratamiento ED presentaron una tendencia a un mayor contenido en grado alcohólico y concentraciones superiores de taninos y catequinas respecto a C, principales compuestos responsables de la astringencia, amargor y estructura de los vinos (Kennedy et al., 2006; Sun et al., 2007). Verdenal et al. (2017) en su estudio observaron una tendencia semejante y también, previamente, Tessarin et al. (2014), cuando aplicaron un deshojado en momentos más avanzados del ciclo en cepas del cv. Longanesi cultivadas en Ravenna (Italia), obtuvieron vinos con mayor sensación alcohólica y astringencia.



Nivel de significación: los datos de cada año se analizaron mediante el test t-Student; * y **: indican significación a $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente.

Figura 4.23. Perfil sensorial gustativo de los vinos del cv. Tempranillo elaborados a partir de las uvas del tratamiento control (C) y deshojado precoz (ED) (campañas 2010-2011).

5

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los efectos del deshojado precoz aplicado sobre la variedad Tempranillo cultivada en Extremadura, estuvieron muy condicionados por las características climáticas del año de la cosecha:

DESARROLLO VEGETATIVO Y COMPONENTES DE LA PRODUCCIÓN

El deshojado precoz realizado en prefloración, en general, provocó una tendencia a la reducción del área foliar total media de las cepas, aunque dicho efecto dependió del año. Por otra parte, en el año 2010 en el que la aplicación del deshojado fue más intensa, las cepas mostraron un crecimiento vegetativo compensatorio.

El deshojado precoz redujo la tasa cuajado, lo que provocó un menor número bayas por racimo, y por lo tanto menor peso de racimo, reduciéndose la producción. Este efecto estuvo condicionado por el año de la cosecha.

COMPOSICIÓN Y CALIDAD DE LA UVA

El deshojado precoz provocó un adelanto en la maduración tecnológica y fenólica de la uva en los tres años de estudio. En las uvas vendimiadas con similar valor de sólidos solubles totales provocó un incremento de los valores de potasio en la uva y un descenso del ácido tartárico en los mostos. En el resto de los parámetros analizados se observó una tendencia a presentar mayores niveles cuando se aplicó el deshojado precoz en comparación con el tratamiento control.

La concentración del nitrógeno aminoacídico total (FAN), nitrógeno aminoacídico asimilable (AAA-N), nitrógeno asimilable por las levaduras (YAN) y precursores aromáticos nitrogenados (PAN) de los mostos, dependió del año considerado y no se vieron afectados por la aplicación del deshojado precoz. A nivel individual, 12 aminoácidos modificaron su concentración en los mostos procedentes del deshojado precoz, mayoritariamente en el año 2011.

Los hollejos de las uvas procedentes de cepas en las que se aplicó el deshojado precoz presentaron mayores concentraciones de flavonoles y ácidos hidroxycinámicos en el hollejo, fundamentalmente en el año 2010. Por tanto, el deshojado precoz aplicado en

pre-floración podría incrementar la concentración de los compuestos que intervienen en las reacciones copigmentación, importantes para la estabilidad de color vino.

COMPOSICIÓN Y CALIDAD DEL VINO

En los vinos, el deshojado precoz provocó una disminución significativa del ácido málico y de la acidez total y un incremento del ácido tartárico y de la concentración de los compuestos fenólicos totales, antocianos totales y antocianos copigmentados así como de la intensidad de color respecto de los elaborados a partir de las cepas control.

A nivel de composición aromática, los vinos ED (procedentes de cepas a las que se aplicó el deshojado precoz) presentaron valores significativamente superiores de alcoholes, compuestos en C6, esteres etílicos, ácidos volátiles y compuestos carbonílicos respecto de los C (procedentes de las cepas control). Como consecuencia de lo anterior, el valor de la actividad odorífera de los compuestos que aportan aromas frutales fue superior en los vinos ED. Este efecto tuvo mayor significación en el año 2009.

Sensorialmente, los vinos ED se caracterizaron por mayores puntuaciones en los descriptores color violáceo y aroma a frutos rojos e intensidad de color que los C. Además, el incremento de la tanicidad y de la estructura en boca de los vinos procedentes de cepas deshojadas puso de manifiesto la obtención de vinos más equilibrados.

Los resultados obtenidos indican que, bajo las condiciones agroclimáticas del presente estudio, el deshojado precoz puede convertirse en una herramienta útil para el control del rendimiento productivo de la vid, mejorando ciertas características físico-químicas de las uvas y, en consecuencia, mejorar el potencial enológico de los vinos de Tempranillo.

6

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIGRÁFICAS

A

- Acimovic, D., Tozzini, L., Green, A., Sivilotti, P. y Sabbatini P. (2016). Identification of a defoliation severity threshold for changing fruitset, bunch morphology and fruit composition in Pinot Noir. *Aust. J. Grape Wine Res.* 22, 399-408.
- Adams, D.O. (2006). Phenolics and ripening in grape berries, *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 249–256.
- Alessandrini, M., Battista, F., Panighel, A., Flamini R. y Tomasi, D. (2018). Effect of pre-bloom leaf removal on grape aroma composition and wine sensory profile of Semillon cultivar. *J. Sci. Food Agric.* 98(5), 1674-1684.
- Allewelt, G., Düring, H. y Jung, K. H. (1984). Zum Einfluss des Klimas auf Beerentwicklung, Ertrag, und Qualitt bei Reben: Ergebnisse einer siebenjährigen Faktorenanalyse. *Vitis* 23:127-42.
- Anness, B.J. y Bamforth, C.W. (1982). Dimethyl sulphide—A review. *J. Inst. Brew.* 88:244-252.
- Arrizabalaga, M., Morales, F., Oyarzun, M., Delrot, S., Gomes, E., Irigoyen, J. J., Hilbert, G. y Pascual, I. (2018). Tempranillo clones differ in the response of berry sugar and anthocyanin accumulation to elevated temperature. *Plant Science.* 267, 74-83.
- Arnold, R.A. y Bledsoe, A.M. (1990). The effect of various leaf removal treatments on the aroma and flavour of Sauvignon Blanc wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 41,74-76.
- Arozarena, I., Ayestaran, B., Cantalejo, M. J., Navarro, M., Vera, M., Abril, I. y Casp, A. (2002). Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyards over two years. *Eur. Food Res. Technol.* 214, 303-309.
- Asensio, M.L, Valdés, E. y Cabello, F. (2001). Estudio de la evolución de la composición amínica durante la maduración en mostos de diferentes variedades de *Vitis vinifera* L. *Viticultura /Enología profesional.* 72, 44-53.
- Avizcuri-Inac, J.M., Gonzalo-Diago, A., Sanz-Asensio, J., Martínez-Soria, M.T., López-Alonso, M., Dizy-Soto, M., Echávarri-Granado, J.F., Vaquero-Fernández, L. y Fernández-Zurbano, P. (2013). Effect of Cluster Thinning and Prohexadione Calcium Applications on Phenolic Composition and Sensory Properties of Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 1124–1137.

B

- Bailly, S., Jerkovic, V., Meurée, A., Timmermans, A. y Collin, S. (2009). Fate of key odorants in sauternes wines through aging. *J. Agric. Food Chem.* 57(18), 8557–8563.

- Bakowska, A.B., Kucharska, A.Z. y Oszmianski, J. (2003). The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chem.* 81,349-355.
- Baranac, J.M., Petranović, N.A. y Dimitrić-Marković, J.M. (1996). Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1333-1336.
- Baranowski, E.S. y Nagel, C.W. (1983). Kinetics of malvidin-3-glucoside condensation in wine model solutions. *J. Food Sci.* 38, 932-936.
- Basile, B., Girona, J., Behboudian, M. H., Mata, M., Rosello, J., Ferré, M. y Marsal, J. (2012). Responses of Chardonnay to deficit irrigation applied at different phenological stages: vine growth, must composition, and wine quality. *Irrig Sci*, 30(5), 397–406.
- Basile, B., Caccavello, G., Giaccone, M. y Forlani, M. (2015). Effects of early shading and defoliation on bunch compactness, yield components, and berry composition of Aglianico grapevines under warm climate conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 66, 234-243.
- Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S. y Drawert, F. (1986). Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 37:927-943.
- Baumes, R. (2009). Wine aroma precursors. En: Moreno-Arribas, M.V. Polo C. (ed.) *Wine Chemistry and Biochemistry*, Nueva York: Springer, pp 261-274.
- Bavaresco, L., Gatti, M., Pezzutto, S., Fregoni, M. y Mattivi, F. (2008). Effect of leaf removal on grape yield, berry composition, and stilbene concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* 59, 292-298.
- Bayonove, L., Baumes, R., Crouzet, J. y Günata, Z. (1998). Arômes. In: Flanzky C (Ed) *Oenologie - Fondements Scientifiques et Technologiques*, Lavoisier Tec & Doc, Paris, France, pp 163-235.
- Bayonove L, Baumes R, Crouzet J. y Günata Z (2000) Aromas. En: Flanzky C (Ed) *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Ed. Mundiprensa, Madrid (España), pp 137-176.
- Bayonove, C. (2003). El aroma varietal: El potencial aromático de la uva. En C. Flanzky (Ed.), *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*, Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, 137-146.
- Bell, A.A.; Ough, C.S. y Kliewer, W.M. (1979). Effects on must and wine composition, rates of fermentation, and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* var. Thompson Seedless grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 30 (2), 124–129.
- Bell, S. J. y Robson, A. (1999). Effect of nitrogen fertilization on growth, canopy density, and yield of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (3), 351–358.

- Bell, S.J. y Henschke, P.A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aus. J. Grape Wine Res.* 11, 242- 295.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M. y Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 70, 246-252.
- Benítez, P., Castro, R. y Barroso, C. G. (2003). Changes in the polyphenolic and volatile contents of “fino” sherry wine exposed to ultraviolet and visible radiation during storage. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6482–6487.
- Bennett, J., Jarvis, P., Creasy, G. L. y Trought, M.C.T. (2005). Influence of defoliation on overwintering carbohydrate reserves, return bloom, and yield of mature Chardonnay grapevines. *Am J Enol Vitic.* 56, 386–393.
- Bergqvist, J., Dokoozlian, N. y Ebisuda, N. (2001). Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (1), 1-7.
- Bindon, K.A., Dry, P.R. y Loveys, B.R. (2007). Influence of plant water status on the production of C13-norisoprenoid precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grape berries. *J. Agric. Food Chem.* 55:4493-4500.
- Blanco, J., Mancha, L.A., Picón, J., Prieto, M.H, Valdés, M.E. y Uriarte, D. (2010). Efectos del deshojado temprano en el desarrollo vegetativo, productivo y composición del mosto en tempranillo (*Vitis vinifera* L.). XXXII Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. I.S.B.N.: 978-84-7930-097-3. Pp. 115-125. Almendralejo, España.
- Bledsoe, A. M., Kliewer, W.M. y Marois, J.J. (1988). Effects of timing and severity of leaf removal on yield and fruit composition of Sauvignon Blanc grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 49–54.
- Bloonfield, D.G., Heatherbell, D.A. y Pour Nikfardjam, M.S. (2003). Effect of p-coumaric acid on the color of red wine. *Mitt. Klosterneuburg* 53:195-198.
- Bloor, S.J. y Falshaw, R. (2000). Covalently linked anthocyanin-flavonol pigments from blue *Agapanthus* flowers. *Photochem.* 53, 575-579.
- Blouin, J. (1973). Manuel pratique d'analyses des moûts et des vins. Bordeaux: Fédération des CEIOE Gironde.
- Blouin, J. y Peynaud, E. (2004). Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino. Ed. Mundi-Prensa. 4ª Edición.
- Boidron, J.N., Chatonnet, P. y Pons, M. (1988). Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Connaiss. Vigne Vin* 22, 275-294.

- Bolin, H.R. y Petrucci, V. (1985). Aminoacids in raisins. *J. Food Sci.* (50), 1507.
- Bordiga, M., Travaglia, F., Locatelli, M., Cosson, J.D. y Arlorio, M. (2011). Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chem.* 127, 180–187.
- Bordiga, M., Lorenzo, C., Pardo, F., Salinas, M., Travaglia, F., Arlorio, M., Coisson, J. y Garder-Cerdán, T. (2016). Factors influencing the formation of histaminol, hydroxytyrosol, tyrosol, and tryptophol in wine: Temperature, alcoholic degree, and amino acids concentration. *Food Chem.* 197, 1038-1045.
- Boulton, R. B. (1996). Methods for the assement of copigmentation in red wines. Presented at the 47th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture, Reno, NV.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 67-87.
- Brouillard, R. Mazza, G., Sad, Z., Albrecht-Gary, A.M. y Cheminat, A. (1989). The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for structural study of aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 2604 – 2610.
- Bubola, M., Persurie, D., Ganie, K. K. y Cossetto, M. (2009). Influence of timing and intensity of basal leaf removal on aromatic composition of cv. Istrian Malvasia wines (pp. 64–65). Abstracts Book III Int. Symp. ‘Malvasias’, Canary Islands.
- Bubola, M., Sivilotti, P., Janjanin, D. y Poni, S. (2017). Early Leaf Removal Has Larger Effect than Cluster Thinning on cv. Teran Grape Phenolic Composition. *Am. J. Enol. Vitic.* In Press
- Bureau, S., Razungles, A.J. y Baumes, R. (2000). The aroma of Muscat of Frontignan grapes/ Effect of light environment of vine and bunch on volatiles and glycoconjugates. *J. Sci. Food Agr.* 80, 2012–2020.

C

- Cabello, F., Rodríguez-Torres, I., Muñoz-Organero, G., Rubio, C., Benito, A. y García-Beneytez, S. (2003). La colección de variedades de “El Encín”. Consejería de Economía e Innovación Tecnológica. Comunidad de Madrid.
- Cacho, J., Fernandez, P., Ferreira, V. y Castells, J. E. (1992). Evolution of five anthocyanidin-3-glucosides in the skin of the Tempranillo, Moristel, and Garnacha grape varieties and influence of climatological variables. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 244-248.
- Canals, R., Llaudy, M.C., Valls, J., Canals, J.M. y Zamora, F. (2005). Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds

of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4019–4025.

Candolfi-Vasconcelos, M.C. y Koblet, W. (1990). Yield, fruit quality, bud fertility and starch reserves of the wood as a function of leaf removal in *Vitis vinifera*: evidence of compensation and stress recovering. *Vitis* 29, 199–221.

Candolfi-Vasconcelos, M.C., Candolfi, M.P. y Koblet, W. (1994). Retranslocation of carbon reserves from the woody storage tissue into the fruit as a response to defoliation stress during the ripening period in *Vitis vinifera*. *Planta* 192, 567–573.

Caspari, H.W. y A. Lang. (1996). Carbohydrate supply limits fruit- set in commercial Sauvignon blanc grapevines. In *Proceedings for the Fourth International Symposium on Cool Climate Enology and Viticulture*. T. Henick-Kling et al. (Eds.), pp. II 9-13. New York State Agriculture Experiment Station, Geneva, New York.

Castellarin, S., Matthews, M.A., Di Gaspero, G. y Gambetta, G.A. (2007). Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoids biosynthesis in grape berries. *Planta* 227, 101-112.

Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. y Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.* 7;55(3), 992-1002.

Chang, S.S. y Kliwer, W.M. (1991). Effect of nitrogen forms and rates, shading, and presence and absence of Ca on the growth, tissue nitrogen compositions, and fruit quality of grapevines. *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*. 228-238.

Chapman, D.M., Matthews, M.A. y Guinard, J.X. (2004). Sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines made from vines with different crop yields. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 325-334.

Chatonnet, P., Dubordieu, D. y Boidron, J. (1995). The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines», *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 463-468.

Cheyrier, V. y Rigaud, J. (1986). HPLC Separation and Characterization of Flavonols in the Skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *Am. J. Enol. Vitic.* 37(4), 248-252.

Cheyrier, V., Moutounet, M. y Sarni-Manchado, P. (1998). Les composés phénoliques In *Oenologie, fondements scientifiques et technologiques*. C. Flanzy (Ed.), pp. 124-164. Lavoisier Tec & Doc, Paris.

Cheyrier, V., Remy, S. y Fulcrand, H. (2000). Mechanisms of anthocyanin and tannin changes during winemaking and aging. En: *The ASEV 50 th Anniversary Annual Meeting*. Rautz, J. (Ed.), ASEV, Davis, CA, pp. 337- 344.

- Chorti, E., Guidoni, S., Ferrandino, A. y Novello, V. (2010). Effect of different cluster sunlight exposure levels on ripening and anthocyanin accumulation in Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 61:23-30.
- Coelho, E., Rocha, S.M., Delgadillo, I. y Coimbra, M.A. (2006). Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. 'Baga' ripening. *Anal. Chim. Acta.* 563, 204-214.
- Cohen, S. y Kennedy, J. (2010). *Plant Metabolism and the environment: implications for managing phenolics.* Department of Food Science and Technology. USA.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S. y Geròs, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1, 1-22.
- Conradie, W. J. (2001). Timing of nitrogen fertilisation and the effect of poultry manure on the performance of grapevines on sandy soil. II. Leaf analysis, juice analysis and wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 22, 60–68.
- Coombe, B.G. (1962). The effect of removing leaves, flowers and shoot tips on fruit-set in *Vitis vinifera* L. *J. Hortic. Sci.* 37:1-15.
- Coombe, B.G. (1995). Growth Stages of the Grapevine: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Aust. J. Grape Wine Res.* 1, 104-110.
- Cordonnier, R. (1977). L'arôme des vins. *Rev. Fr. D'Oenol.*, 53, 15-26.
- Cordonnier, R. y Bayonove, C. (1981). Etude de la phase prbfermentaire de la vinification: extraction et formation de certains composts de l'arhme, cas des terpenols, des aldehydes et des alcools en C₆. *Corm.Vigne Vin* 15, 269-286.
- Cortell, J.M. y Kennedy, J.A. (2006). Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) Pinot noir fruit and extraction in a model system. *J. Agric. Food Chem.* 54:8510-8520.
- Cortell, J.M., Halbleib, M., Gallagher, A.V., Righetti, T.L. y Kennedy, J.A. (2007). Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) anthocyanins. 1. Anthocyanin concentration and composition in fruit. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6575-6584.
- Cravero, M.C. y Di Stefano, R. (1990). Il composti fenoloci e l'origine varietale delle uve. *Rev. Vitic. Enol.* 11, 38-40.
- Crespo, J. (2017). Efecto de prácticas vitícolas sobre el perfil aromático de vinos blancos en la D.O. "Vinos de Madrid". Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Crippen Jr, D. D. y Morrison, J. C. (1986). The effects of sun exposure on the compositional development of Cabernet Sauvignon berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 235-242.

- Crouzet, J.; Flanzy, C.; Günata, Y.Z.; Pellerin, P. y Sapis, J.C. (1998). Les enzymes en oenologie. In: OEnologie - Fondements Scientifiques et Technologiques, Chap. nº 10, Lavoisier Tec & Doc (Eds.), Paris, 361–411.
- Cuevas, E. (2001). Estudios de mecanismos de adaptación ecofisiológica de la vid (*Vitis vinifera* L., cv. Tempranillo) al déficit hídrico. Evaluación del consumo de agua y de las respuestas agronómicas en diferentes regímenes hídricos. Tesis Doctoral. Dpto. Producción Vegetal: Aotecnía. Universidad Politécnica de Madrid.

D

- Dai, Z. W., Ollat, N., Gomès, E., Decroocq, S., Tandonnet, J. P., Bordenave, L. y Delrot, S. (2011). Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 62(4), 413-425.
- Dal Santo, S., Tornielli, G.B., Zenoni, S., Fasoli, M., Farina, L., Anesi, A., Guzzo, F., Delledonne M. y Pezzotti, M. (2013). The plasticity of the grapevine berry transcriptome. *Genome Biol.* 14, R54.
- Darias-Martin, J., Carrillo, M., Díaz, E. y Boulton, R.B. (2001). Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chem.* 73, 217- 220.
- Darias-Martín, J., Martín-Luis, B., Carrillo-López, M., Lamuela-Raventós, R., Díaz- Romero, C. y Boulton, R. B. (2002). Effect of caffeic acid on the color of red wine. *J Agric Food Chem.* 50, 2062-2067.
- Davies, W. y Zhang, J. (1991). Root signals and the regulation of growth and the development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 55–76.
- De Freitas, V.A.P., Glories, Y. y Monique, A. (2000) Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 397–403.
- De Mora, S.J., Eschenbruch, R., Knowles, S.J. y Spedding D.J. (1986). The formation of dimethyl sulphide during fermentation using a wine yeast. *Food Microbiol.* 3, 27-32.
- Delgado, R., Martín, P., del Álamo, M. y González, M. (2004). Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *J. Sci. Food Agric.* 84, 623–630.
- Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T., Carde, J.P., Merillon, J.M. y Hamdi, S. (2006). Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology.* 140, 499-511.

- Deluc, L.G., Quilici, D.R., Decendit, A., Grimplet, J., Wheatley, M.D., Schlauch, K.A., Merillon, J., Cushman, J.C. y Cramer, G.C. (2009). Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics*. 10, 1–33.
- Di Stefano, R. Borsa, D., Maggiorotto, G. y Corino, L. (1995). Terpeni e polifenoli di uve aromatiche a frutto colorato prodotte in Piemonte. *L'Enotecnico*, 31, 75-85.
- Di Stefano, R., Borsa, D., Ummarino, I., Gentilini, N. y Follis, R. (2002). Evoluzione della composizione polifenolica di uve da cultivars diverse durante la maturazione. *L'Enotecnico*, Octubre, 2002, 81-96
- Diago, M.P. (2010). Estudio y desarrollo del deshojado precoz como técnica para el control del rendimiento productivo de la vid (*Vitis vinifera* L.). Efectos sobre el desarrollo vegetativo, los componentes de la producción, así como sobre la composición y la calidad de la uva y el vino. Tesis Doctoral. Universidad de la Rioja.
- Diago, M. P., Vilanova, M. y Tardaguila, J. (2010). Effects of timing of manual and mechanical early defoliation on the aroma of *Vitis vinifera* L. Tempranillo wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 61, 382–391.
- Diago, M.P., Ayestaran, B., Guadalupe, Z., Poni, S. y Tardáguila, J. (2012a). Impact of prebloom and fruit set basal leaf removal on the flavonol and anthocyanin composition of Tempranillo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 63, 367-376.
- Diago, M.P., Ayestarán, B., Guadalupe, Z., Garrido, A. y Tardaguila, J. (2012b). Phenolic composition of Tempranillo wines following early defoliation on the vines. *J. Sci. Food Agric.* 92:925-934.
- Díaz-Plaza, M., Lorente, E. M., Reyero, J. R., Pardo, F. y Salinas, M. R. (2000). Aportación al estudio de la maduración de varias viníferas tintas cultivadas en la D.O. Jumilla. *Viticultura/Enología Profesional*, nº 68, mayo-junio. 37–46.
- Dixit, V., Tewari, J.C., Cho, B. y Irudayaraj, J.M.K. (2005). Identification and quantification of industrial grade glycerol adulteration in red wine with Fourier transform infrared spectroscopy using chemometrics and artificial neural networks. *Applied Spectroscopy* 2005; 59: 1553-1561.
- Dokoozlian, N. y Kliewer, W.M. (1996). Influence of light on the grape berry growth and composition varies during fruit development. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 121 (5), 869-874.
- Downey, M., Harvey, J. y Robinson, S. (2003) Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.* 9, 15–27.
- Downey, M.O., Harvey, J.S. y Robinson, S.P. (2004). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10, 55-73.

- Downey, M.O., Dokoozlian, N.K. y Krstic, M.P. (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 257–268.
- Drawert, F., Kler, A. y Berger, R.G. (1986). Biotechnologische Erzeugung von Aromastoffen. I. Optimierung der Ausbeuten von (E)-ZHexenal bei Pflanzlichen Gewebehomogenaten. *Lebensmitt- Wiss. Technol.*, 19, 42631.
- Dubois, P. (1994). Les arômes des vins et leurs défauts (cont.). *Revue Française d'OEnologie* 145, 27–40.
- Duchêne, E. y Schneider, C. (2005). Grapevine and climatic changes: a glance at the situation in Alsace. *Agronomy for Sustainable Development*. 25, 93–99.

E

- Ector, B.J., Magee, J.B., Hedwood, C.P. y Coign, M.J. (1996). Resveratrol concentration in muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 57-62.
- Enzell, C. (1985). Biodegradation of carotenoids - an important route to aroma compounds. *Pure Applied Chemistry* 57 (5), 693–700.
- Esteban, M.A., Villanueva, M.J. y Lisarrague, J.R. (1999). Effect of irrigation on changes in berry composition of Tempranillo during maturation. Sugars, organic acids, and mineral elements. *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (4), 418-434.
- Etaio, I., Pérez Elortondo, F.I., Albisu, M., Gaston, E., Ojeda, M. y Schlich, O. (2008). Development of a quantitative sensory method for the description of young red wines from Rioja Alavesa. *J. Sens. Stud.* 23, 631–655.
- Etiévant, P.X. (1991). Wine. In H. Maarse (Ed.), *Volatile compounds in food*. Food Science and Technology. (pp. 483–546). New York: Marcel Dekker Inc.
- Ewart, A. y Kliewer, W.M. (1977). Effects of controlled day and night temperatures and nitrogen on fruit-set, ovule fertility and fruit composition of several wine grape cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 28, 88-95.

F

- Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H.T., Ferreira, A.C. y Bauer, F.F. (2017) The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Front. Microbiol.* 8:2554.
- Fanzone, M., Peña-Neira, A., Gil, M., Jofré, V., Assof, M. y Zamora, F. (2012). Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. *Food Res. Int.* 45, 402–414.

- Ferrandino, A., Carra, A., Rolle, L., Schneider, A. y Schubert, A. (2012). Profiling of hydroxycinnamoyl tartrates and acylated anthocyanins in the skin of 34 *Vitis vinifera* genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4931–4945.
- Ferrée, D.C., McCartney, S.J. y Scurlock, D.M. (2001). Influence of irradiance and period of exposure on fruit set of French-American hybrid grapes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126:283-290.
- Ferreira, V., Fernández, P. y Cacho, J.F. (1996). A study of factors affecting wine volatile composition and its application in discriminant analysis. *Food Sci. Technol.* 29, 251-259.
- Ferreira, V., López, R. y Cacho, J.F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1659-1667.
- Ferreira, V. y Cacho, J. (2009). Identification of impact odorant in wine. En: Moreno-Arribas, M.V. Polo C. (ed.). *Wine Chemistry and Biochemistry*, Nueva York: Springer, pp 393-415.
- Filippetti, I., Allegro, G., Valentini, G., Pastore, C., Poni, S. y Intrieri, C. (2011). Effects of mechanical pre-bloom defoliation on cordon de royat pruned Sangiovese (*Vitis Vinifera* L.) vines. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 45, 19–25.
- Filippetti, I., Movahed, N., Allegro, G., Valentini, G., Pastore, C., Colucci, E. y Intrieri, C. (2015). Effect of post-veraison source limitation on the accumulation of sugar, anthocyanins and seed tannins in *Vitis vinifera* cv. Sangiovese berries. *Aust. J. Grape Wine Res.* 21, 90–100.
- Font Tullot, I. (1956). La insolación en España. *Boletín Mensual Climatológico*, Madrid, pp. 3-7.
- Forde, B.G. y Lea, P.J. (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *J. of Exp. Bot.* **58**, 2339-2358.
- Fragoso, S., Mestres, M., Busto, O. y Guasch, J. (2010). Comparison of three extraction methods used to evaluate phenolic ripening in red grapes. *J Agric. Food Chem.* 58 (7) ,4071-4076.
- Francis, I. y Newton, J. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 114–126.
- Freeman, B.M., Lee, T.H. y Tuckington, C. (1979). Interaction of irrigation and pruning level on grape and wine quality of Shiraz wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 218-223.
- Fregoni, M. (1977). Irrigation des vignobles. Problèmes de physiologie, de biochimie, de génétique, d'agronomie, de technologie et d'économie. *Bulletin OIV*, vol 551, 1-19 37.

- Fregoni, M. (1999). Maduración de la uva, desarrollo y metabolismo de la baya. Evolución de los componentes: polímeros y aromas. En: Seminario Internacional. Hacia la enología del siglo XXI. Mendoza, Argentina. 229 p.
- Fregoni, C., Pezzutto, S. (2000). Principes et premières approches de l'indice bioclimatique de qualité de Fregoni. Progr. Agric. Vitic. 18, 390–396.
- Fremont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. Life Sciences 66, 663–673.
- Friedel, M., Stoll, M., Patz, C. D., Will F. y Dietrich, H. (2015). Impact of light exposure on fruit composition of white 'Riesling' grape berries (*Vitis vinifera* L.). Vitis 54, 107–116.

G

- Galet, P. (1988). Cultivars and Vineyards in France. Vol. 1. The American Vitis Species and Their Cultivars. 2d ed. ENSA, Montpellier, France.
- Gamero, E., Moreno, D., Vilanova, M., Uriarte D., Prieto M.H. y Valdés, M.E. (2014). Effect of cluster thinning and water stress on chemical and sensory characteristics of Tempranillo wines. Aust. J. Grape Wine Res. 394 - 400.
- Gamero, E. (2015). Incidencia del riego y el nivel de carga sobre la calidad de uvas cv. Tempranillo en Extremadura. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
- Gamero, E; Espinosa, F; Moreno, D; Uriarte, D; Prieto, MH; Garrido, I; Valdés, E. (2018). Convenience of Applying of Viticulture Technique as a Function of the Water Status of the Vine-Stock In: Grapes and Wines - Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization, pp 91-115. Edited by [António Manuel Jordão and Fernanda Cosme](#), ISBN 978-953-51-3834-1, Print ISBN 978-953-51-3833-4, 384 pages: InTech Publishers, <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72799>
- García, J., Zheng, W., Balda, P. y Martínez de Toda, F. (2017). Varietal differences in the sugar content of red grapes at the onset of anthocyanin synthesis. Vitis. 56 (1), 15-18.
- García de los Salmenes, N. (1914). Memoria General del Congreso Nacional de Viticultura de Pamplona.
- García-Escudero, E., López, R., Santamaría, P., Zaballa, O. y Arbizu, J. (1995). El control del rendimiento por aclareo de racimos. Experiencias sobre cv. Mazuelo. Zubía Monográfico 7, 53-64.
- Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A.R., Arias-Gil, M., Martín-Belloso, O. y Ancín-Azpilicueta C. (2007). Influence of SO₂ on the consumption of nitrogen compounds through alcoholic fermentation of must sterilized by pulsed electric fields. Food Chem. 103, 771-777.

- Garde-Cerdán, T. y Ancín-Azpilicueta, C. (2008). Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT- J. Food Sci. Technol.* 41, 501-510.
- Garde-Cerdán, T., Lorenzo, C., Lara, J. F., Pardo, F., Ancín-Azpilicueta, C. y Salinas, M. R. (2009). Study of the evolution of nitrogen compounds during grape ripening. Application to differentiate grape varieties and cultivated systems. *J. Agric. Food Chem.* 57(6), 2410–2419.
- Garde-Cerdán, T., López, R., Portu, J., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I. y Santamaría, P. (2014). Study of the effects of proline, phenylalanine, and urea foliar application to Tempranillo vineyards on grape amino acid content. Comparison with commercial nitrogen fertilisers. *Food Chem.* 163, 136–141.
- Garde-Cerdán, T., Portu, J., López, R. y Santamaría, P. (2015). Effect of foliar applications of proline, phenylalanine, urea, and commercial nitrogen fertilizers on stilbene concentrations in Tempranillo musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 66, 542-547.
- Garde-Cerdán, T., Portu, J., López, R. y Santamaría, P. (2016). Effect of methyl jasmonate application to grapevine leaves on grape amino acid content. *Food Chem.* 203, 536–539.
- Gatti, M., Bernizzoni, F., Civardi, S. y Poni, S. (2012). Effects of Cluster Thinning and Preflowering Leaf Removal on Growth and Grape Composition in cv. Sangiovese. *Am. J. Enol. Vitic.* 63, 325–332.
- Gawel, R. (1998). Red wine astringency: A review. *Aust. J. Grape Wine Res.* 4, 74-95.
- Genovese, A., Gambuti, A., Piombino, P. y Moio, L. (2007). Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine. *Food Chem.* 103, 1228–1236.
- Gerdes, S.M., Winterhalter, P. y Ebeler, S.E. (2002). Effect of sunlight exposure on norisoprenoid formation in White Riesling grapes. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*. P. Winterhalter and R. Rouseff (eds.), pp. 262-272. ACS Symp. Series 802. Am. Chemical Society, Washington, DC.
- Giovanelli, G. y Brenna, O.V. (2007). Evolution of some phenolic components, carotenoids and chlorophylls during ripening of three Italian grape varieties. *Eur. Food Res. Technol.* 225, 145-150.
- Glories, Y. (1999a). La maturità fenolica delle uve: primo parámetro da controllare per una corretta vinificazione in rosso. *Vignevini* 3, 46-50.
- Glories, Y. (1999b). Phenolic maturity of grapes: a determinant of optimal red wine production. *Rivista Italian Viticulture Enology*, 26, 46-50.

- Gockowiak, H. y Henschke, P. (1992) Nitrogen composition of grape juice and implications for fermentation: results of a survey made in N-E Victoria. *Australian Grapegrower & Winemaker* 340, 131–138.
- Goldberg, D.M., Yan, J., Ng, E., Diamandis, E.P., Karumanchiri, A., Soleas, G. y Waterhouse, A.L. (1995). A global survey of trans-reveratrol concentrations in commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 159-165.
- Goldberg, D., Karumanchiri, A., Tsang, E. y Soleas, G. (1998). Catechin and epicatechin concentrations in wines: regional and cultivar related differences. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 23–34.
- Goldspink, B. y Gordon, C. (1991). Responses of *Vitis vinifera* cv. Sauvignon blanc grapevines to timed applications of nitrogen fertilisers. In: 'Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wine'. Ed. J.M. Rantz (American Society for Enology and Viticulture: Davis, California). pp. 255–258.
- Gómez, E., Martínez, A. y Laencina, J. (1995). Changes in volatile compounds during maturation of some grape varieties. *J. Sci. Food Agric.* 67, 229-233.
- Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. y Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *J. Food Comp. Anal.* 20, 618-626.
- Gómez-Cordovés, C., González-SanJosé, M.L., Junquera, B. y Estrella, Y. (1995). Correlation between flavonoids and color in red wines aged in wood. *Am J Enol Vitic.* 46 (3): 295-298
- González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J.C. y Santos-Buelga, C. (2004). Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta* 513:283-289.
- González-Neves, G., Gil, G., Favre, G. y Ferrer, M. (2011). Potencial polifenólico de la uva: índices propuestos y posibles aplicaciones. *Comunicata Scientiae* 2(2): 57-69.
- González-San José, M. L., Barron, L. J. R. y Díez, C. (1990). Evolution of anthocyanins during maturation of tempranillo grape variety (*Vitis vinifera*) using polynomial regression models. *J. Sci. Food Agric.* 51, 337–343.
- González-San José, M.L., Guasch, J., Puerta, B., Ayestaran, B., Intrigliolo, D., Gómez-Cordovés, M.C. y Valdés, M.E. (2014). Effects of terroir factor on the ripening step of Tempranillo grapes. Xth International Terroir Congress. *Proceedings Vol.2.* 340-345.
- González-Santamaría, R., Ruiz-González, R., Nonell, S., Garde-Cerdán, T. y Pérez-Álvarez, E.P. (2017). Influence of foliar riboflavin applications to vineyard on grape amino acid content. *Food Chem.* 240, 601-606.

- Gregan, S., Wargent, J., Liu, L., Shinkle, J., Hofmann, R., Winefield, C., Trought, M. y Jordan, B. (2012). Effects of solar ultraviolet radiation and canopy manipulation on the biochemical composition of Sauvignon Blanc grapes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 18(2), 227-238.
- Grimplet, J., Deluc, L.G., Tillett, R.L., Wheatley, M.D., Schlauch, K.A., Cramer, G.R. y Cushman, J.C. (2007). Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics.* 8:187.
- Guan, L., Wu, B., Hilbert, G., Li, S., Gomès, E., Delrot, S. y Dai, Z. (2017). Cluster shading modifies amino acids in grape (*Vitis vinifera* L.) berries in a genotype- and tissue-dependent manner. *Food Research International*, 98, 2–9.
- Gubler, W.D., Bettiga, L.J. y Heil, D. (1991). Comparisons of hand and machine leaf removal for the control of Botrytis bunch rot. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 233-236.
- Gueffroy, D.E., Kepner, R.E. y Webb, A.D. (1971). Acylated anthocyanin pigments in *Vitis vinifera* grapes: Identification of malvidin- 3-(6-p-coumaroyl) glucoside. *Phytochem.* 10, 813-819.
- Guerrero, R. F., Liazid, A., Palma, M., Puertas, B., González-Barrio, R., Gil-Izquierdo, Á. y Cantos-Villar, E. (2009). Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chem.* 112(4), 949–955.
- Guidoni, S., Allara, P. y Schubert, A. (2002). Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 224-226.
- Guidoni, S., Ferrandino, A. y Novello, V. (2008). Effects of seasonal and agronomical practices on skin anthocyanin profile of Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 59, 22-29.
- Guillou, I. y Bertrand, A. (1995). Dosage des aldehydes des vins. Influence de l'hydroxygénation des most sur leur teneurs dans les vins. En: *V Symposium International Oenologie. Actualités Oenologiques* 95. Lavoisier Ed. Pp 574-578. Paris.
- Guilloux, M. (1981). Evolution des composés phénoliques de la grappe pendant la maturation du raisin. Influence des facteurs naturels. Thèse 3ème Cycle, Université de Bordeaux II.
- Günata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L. y Cordonnier, R.E. (1985). The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr. A* 331:83-90.

H

- Harbertson, J.F., Kennedy, J.A. y Adams, D.O. (2002). Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah and Pinot Noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 54–59.

- Haselgrove, L., Botting, D., van Heeswijck, R., Hoj, P.B., Dry, P.R., Ford, C. y Iland, P.G. (2000). Canopy microclimate and berry composition: the effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L cv. Shiraz grape berries. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 141–149.
- Hashizume, K. y Samuta, T. (1999). Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* 50:194-198.
- He, Z. L., Yang, X. E. y Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* Elsevier.
- He, F., Mu, L., Yan, G.L., Liang, N.N., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves, M.J. y Duan, C.Q. (2010). Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules* 15, 9057-9091.
- Hebrero, E., Santos-Buelga, C. y Rivas-Gonzalo, J.C. (1988). High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Spectroscopy Identification of Anthocyanins of *Vitis vinifera* variety Tempranillo. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 227-233.
- Henschke, P. y Jiranek, V. (1993) Yeasts–metabolism of nitrogen compounds. In: *Wine. Microbiology and biotechnology*, G.H. Fleet (Ed), Harwood Academic, Chur, pp. 77–164.
- Hermosín-Gutiérrez, I., Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S. y García-Romero, E. (2011). Flavonol profiles for grape and wine authentication. In *Progress in Authentication of Food and Wine*. ACS Symposium series. S.E. Ebeler et al. (eds.), pp. 113-129. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Hernández-Orte, P., Guitart, A. y Cacho, J. (1999). Changes in the concentration of amino acids during the ripening of *Vitis vinifera* Tempranillo variety from the Denomination d'Origine Somontano (Spain). *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 144-154.
- Hernández-Orte, P., Cacho, J. F. y Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *J. Agric. Food Chem.* 50(10), 2891-9
- Hernandez-Orte, P., Ibarz, M.J., Cacho, J. y Ferreira, V. (2005). Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chem.* 89, 163–174.
- Hidalgo, J. (2003). *Tratado de Enología*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España).
- Hidalgo, J. (2006). *La calidad del vino desde el viñedo*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (España).
- Hidalgo, L. e Hidalgo, J. (2011). *Tratado de viticultura I*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (España).

- Hilbert, G., Soyer, J.P., Molot, C., Giraudoun, J., Milin, S. y Gaudillere, J.P. (2003). Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot. *Vitis* 42:69–76.
- Hofäcker, W., Alleweldt, G. y Khader, S. (1976). Einfluss von Umweltfaktoren auf Beerenwachstum und Mostqualität bei der Rebe. *Vitis*. 15, 96-112.
- Huang, Z. y Ough, C.S. (1989). Effect of vineyard locations, varieties and rootstocks on the juice amino acid composition of several cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 135–139.
- Huang, Z. y Ough, C.S. (1991). Amino acid profiles of commercial grape juices and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 261–267.
- Hufnagel, J.C. y Hofmann, T. (2008). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1376-1386.
- Huglin, P. (1978). Nouveau mode d'évaluation des possibilités héliothermiques d'un milieu viticole. *C.R. Acad. Agric.* 64, 1117-1126.
- Hunter, J.J. y Ruffner, H.P. (1997). Diurnal and seasonal changes in nitrate reductase activity and nitrogen content of grapevines: Effect of canopy management. *Vitis* 36, 1-6.

I

- Iland, P., Bruer, N., Edwards, G., Weeks, S. y Wilkes, E. (2004). Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts (Patrick Iland Wine Promotions: Campbelltown, SA, Australia).
- Ingledeu W.M. y Kunkee R.E. (1985). Factors Influencing Sluggish Fermentations of Grape Juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, (1), 65-76.
- Intrieri, C., Filippetti, I., Allegro, G., Centinari, M. y Poni, S. (2008). Early defoliation (hand vs mechanical) for improved crop control and grape composition in Sangiovese (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* 14, 25–32.
- Intrigliolo, D.S. y Lakso, A.N. (2009). Berry abscission is related to berry growth in *Vitis labruscana* cv. Concord and *Vitis vinifera* cv. Riesling. *Vitis* 48, 53–54.
- Intrigliolo, D.S. y Castel, J.R. (2010). Response of grapevine cv. 'Tempranillo' to timing and amount of irrigation: water relations, vine growth, yield and berry and wine composition. *Irrigation Sci.* 28, 113-125.
- Intrigliolo, D. S., Lizama, V., García-Esparza, M. J., Abrisqueta, I. y Álvarez, I. (2015). Effects of post-veraison irrigation regime on Cabernet Sauvignon grapevines in Valencia, Spain: Yield and grape composition. *Agric. Water Manag.* 170, 110-119.

ISO 11035 (1994). Sensory analysis, identification and selection of descriptors for establishing a sensory profile by a multidimensional approach.

J

Jackson, D. y Schuster, D. (1987). Production of Grapes in Cool Climates. Butterworths, New Zealand.

Jackson, D. I. y Cherry, N. J. (1988). Prediction of a district's grape-ripening capacity using a latitude- temperature index (LTI). Am. J. Enol. Vitic. 39, 19-28.

Jackson, D.I. y Lombard, P. B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality - A Review. Am. J. Enol. Vitic. 44: 409-430.

Jackson, R.S. (2008). Wine Science Principles and Applications, 3rd ed. Academic Press, Burlington, MA.

Jeandet, P., Bessis, R. y Gautheron, B. (1991). The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. Am. J. Enol. Vitic. 42, 41-45.

Jones, G.V., White, M.A., Cooper, O.R. y Storchmann, K. (2005). Climate change and global wine quality. Climate Change. 73, 319-343.

Joslin, W.S. y Ough, C.S. (1978). Cause and Fate of Certain C6 Compounds Formed Enzymatically in Macerated Grape Leaves During Harvest and Wine Fermentation. Am. J. Enol. Vitic. 29, 11-17.

Jug, T. y Rusjan, D. (2012). Advantages and disadvantages of UV-B radiations on Grapevine (*Vitis* sp.). Emirates J. Food Agric. 24, 576-585.

K

Kakani, V.G., Reddy, K.R., Zhao, D. y Sailaja, K. (2003). Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. Agric. For. Meteorol. 120, 191-218.

Karoglan, M., Kozina, B. y Orlic, A.J. (2008). The effect of partial defoliation on monoterpene levels of Gewurztraminer wine. Agriculture, 14 (1), 35-40.

Kaserer, H., Blahous, D. y Brandes, W. (1996). Optimising wine grape quality by considering rootstock-scion interaction. Proceedings of Workshop on Strategies to Optimise Wine Grape Quality. Eds. S. Poni, E. Peterlunger, F. Iacono and C. Intrieri. Acta Horticulure 427, 267-276.

Keller, M. y Koblet, W. (1994). Is carbon starvation rather than excessive nitrogen supply the cause of inflorescence necrosis in *Vitis vinifera* L.?. Vitis. 33, 81-86.

- Keller, M. (2010). The science of grapevines: Anatomy and physiology. Academic Press, London.
- Kemp, B., Harrison, R. y Creasy, G.L. (2010). The effect of timing of mechanical leaf removal on Pinot noir berry and wine composition. Proceedings of 7th International Cool Climate Symposium, Seattle, Washington, USA.
- Kemp, B.S., Harrison, R. y Creasy, G.L. (2011). Effect of mechanical leaf removal and its timing on flavan-3-ol composition and concentrations in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir wine. Aust. Jour. Grape Wine Res. 17, 270-279.
- Kennedy, J. (2002). Understanding grape berry development. Practical Winery and Vineyard Jul/Aug, 1–5.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A. y Waterhouse, A.L. (2002). Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. Am. J. Enol. Vitic. 53:4, 268-274.
- Kennedy, J.A., Saucier, C. y Glories, Y. (2006). Grape and wine phenolics: history and perspective. Am. J. Enol. Vitic. 57, 239–248.
- Kennedy, J.A. (2008). Grape and wine phenolics: observations and recent findings. Ciencia e Investigación Agraria, 35, 107–120.
- Kliewer, W.M. y Nassar, A R. (1966). Changes in concentration of organic acids, sugars, and amino acids in grape leaves. Am J Enol Vitic. 17, 48-57.
- Kliewer, W. M. (1968) Changes in the concentration of free amino acids in grape berries during maturation. Am. J. Enol. Vitic. 19, 166-174.
- Kliewer, W.M. (1969). Free amino acids and other nitrogenous substances of table grape varieties. J. Food Sci. 34, 274–278.
- Kliewer, W. M. (1970). Effect of day temperature and light intensity on coloration of *Vitis vinifera* L. grapes. J. Am. Soc. Hort. Sci. 95, 693-7.
- Kliewer, W.M. y Ough, C.S. (1970). The effect of leaf area and crop level on the concentration of amino acids and total nitrogen in Thompson Seedless grapes. Vitis 9, 196–206.
- Kliewer, W.M. (1971). Effect of nitrogen on growth and composition of fruits from Thompson Seedless grapevines. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 96, 816–819.
- Kliewer, W.M. y Torres, R.E. (1972). Effect of controlled day and night temperatures on coloration of grapes. Am. J. Enol. Vitic. 23, 71- 77.
- Kliewer, W.M. (1973). Berry composition of *Vitis vinifera* cultivars as influenced by photo and nycto-temperatures during maturation. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 98, 153-159.

- Kliewer, W.M. (1977). Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 28, 96–103.
- Kliewer, W.M. y Dokoozlian, N.K. (2005). Leaf area/crop weight ratios of grapevines: Influence on fruit composition and wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 170-181.
- Koch, A., Ebeler, S.E., Williams, L.E. y Matthews, M.A. (2012). Fruit ripening in *Vitis vinifera*: Light intensity before and not during ripening determines the concentration of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet Sauvignon berries. *Physiol. Plant.* 145, 275-285.
- Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M. y Zamoras, F. (2011). Use of unripe grapes harvested during cluster thinning as a method for reducing alcohol content and pH of wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 17, 230–238.
- Kozina, B., Karoglan, M., Herjavec, S., Jeromel, A. y Orlic, S. (2008). Influence of basal leaf removal on the chemical composition of Sauvignon Blanc and Riesling wines. *J. Food Agric. Environ.* 6, 28-33.
- Kupina, S.A. y Shrikhande, A.J. (2003). Evaluation of a Fourier transform infrared instrument for rapid quality-control wine analyses. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 131-134.

L

- Lacey, M. J.; Allen, M. S.; Harris, R. L. N. y Brown, W. V. (1991) Methoxypyrazines in Sauvignon blanc Grapes and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 103-108.
- Lam, H.M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo Oliveira, R. y Coruzzi, G.M. (1996). The molecular genetics of nitrogen assimilation into aminoacids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 569–593.
- Lamikanra, O. y Kassa, A.K. (1999). Changes in the free amino acid composition with maturity of the noble cultivar of *Vitis rotundifolia* Michx. grape. *J. Agric. Food Chem.* 47(12), 4837–4841.
- Lasanta, C., Caro, I., Gómez, J. y Pérez, L. (2014). The influence of ripeness grade on the composition of musts and wines from *Vitis vinifera* cv. Tempranillo grown in a warm climate. *Food Res. Int.* 64, 432–438.
- Lawless, H.T. y Heymann, H. (1998). Descriptive analysis. Sensory evaluation of food. Principles and practices (Chapman and Hall, New York).
- Lee, S.H., Seo, M.J., Riu, M., Cotta, J.P., Block, D.E., Dokoozlian, N.K. y Ebeler, S.E. (2007). Vine microclimate and norisoprenoid concentration in Cabernet Sauvignon grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 58 (3), 291–301.
- Lee, J. and Schreiner, R. (2010). Free amino acid profiles from ‘Pinot noir’ grapes are influenced by vine N-status and sample preparation method. *Food Chem.* 119, 484-489.

- Lee J. y Skinkis, P.A. (2013). Oregon 'Pinot noir' grape anthocyanin enhancement by early leaf removal. *Food Chem.* 139, 893-901.
- Leeuwen, C. Van, Trégoat, O., Choné, X., Gaudillère, J. y Pernet, D. (2007). Different environmental conditions, different results: the role of controlled environmental stress on grape quality potential and the way to monitor it. *Proceeding Thirteenth Australian Wine Technical Conference*, 1–8.
- Leigh, R.A. y Wyn-Jones, R.G. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytologist* 97, 1–13.
- Leigh, R.A. (2001). Potassium homeostasis and membrane transport. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164, 193–198.
- Li, Yue., Yao, GuanRong., Chen, Wu., Chen, XinJun., Wang, Jun. y Pan, QiuHong. (2018). Effect of cluster thinning on sugar/acidity and the accumulation of isoprene-derived volatiles in 'Cabernet Sauvignon' grape berries. *J. Fruit Sci.* 35 (2), 185-194.
- Lleti, R., Melendez, E., Ortiz, M., Sarabia, L. y Sanchez M. (2005). Outliers in partial least squares regression - Application to calibration of wine grade with mean infrared data. *Anal Chim Acta.* 544, 60-70.
- Lohitnavy, N., Bastian, S. y Collins, C. (2010). Early leaf removal increases flower abscission in *Vitis vinifera* Semillon. *Vitis* 49, 51–53.
- López, R., Tenorio, C., Gutiérrez, A.R., Garde-Cerdán, T., Garijo, P., González-Arenzana, L. y Santamaría, P. (2012). Elaboration of Tempranillo wines at two different pHs. Influence on biogenic amine contents. *Food Control.* 25(2), 583–590.

M

- Macías, P. (1980). Aportación al estudio de los compuestos nitrogenados en mostos y vinos de Tierra de Barros. *Tesina de Licenciatura. Universidad de Extremadura.*
- Makris, D.P.; Kallithraka, S. y Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: burden, profile and influential parameters. *J. Food Comp. Anal.* 19, 396-404.
- Mallouchos, A., Komaitis, M., Koutinas, A. y Kanellaki, M. (2003). Investigation of volatiles evolution during the alcoholic fermentation of grape must using free and immobilized cells with the help of solid phase microextraction (spme) headspace sampling. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3060-3066.
- MAPAMA (2017a). Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos. Resultados nacionales y autonómicos. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

- MAPAMA (2017b). Informe sobre la aplicación del régimen de autorizaciones para plantaciones de viñedo (2017) y el potencial de producción vitícola en España (a 31 de julio de 2017). Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.
- Marais, J. y Pool, H.J. (1980). Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis* 19, 151–164.
- Marais, J., Versini, G., Wyk, C. y Rapp, A. (1992). Effect of region on free and bound monoterpenes and C13-norisoprenoid concentrations in Weisser Riesling wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 13, 71-77.
- Markovic, J.M.D., Petranovic, N.A. y Baranac, J.M. (2000). A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5530-5536.
- Martínez de Toda, F. y Balda, P. (2013). Delaying berry ripening through manipulating leaf area to fruit ratio. *Vitis* 52(4), 171-176.
- Martínez-Lüscher, J., Sánchez-Díaz, M., Delrot, S., Aguirreolea, J., Pascual, I. y Gomès, E. (2014a). Ultraviolet-B radiation and water deficit interact to alter flavonol and anthocyanin profiles in grapevine berries through transcriptomic regulation. *Plant Cell Physiol.* 55 (11), 1925-1936.
- Martínez-Lüscher, J., Torres, N., Hilbert, G., Richard, T., Sánchez-Díaz, M., Delrot, S., Aguirreolea, J., Pascual, I. y Gomès, E. (2014b). Ultraviolet-B radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries. *Phytochem.* 102, 106–114.
- Maugé, C., Granier, T., Langlois d'Estaintot, B., Gargouri, B., Manigand, C., Schmitter, J., Chaudière, J. y Gallois, B. (2010). Crystal structure and catalytic mechanism of leucoanthocyanidin reductase from *Vitis vinifera*. *J. Mol. Biol.* 397, 1079–1091.
- May, P., Shaulis, N.J. y Antcliff, A.J. (1969). The effect of controlled defoliation in the Sultana vine. *Am. J. Enol. Vitic.* 20:237- 250.
- May, P. (2004) Development after fertilisation. In “Flowering and Fruitset in Grapevines”. P. May (Ed.) Lythrum Press, Adelaide, pp. 63-72.
- Mazza, G. y Brouillard, R. (1990). The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochem.* 29, 1097–1102.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., and Ewert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics and colour of Cabernet Franc, Merlot and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* 47(10), 4009- 4017.
- McKersie B.D. y Leshem Y. (1994). Stress and stress coping in cultivated plants. Dordrecht (Netherlands): Kluwer Academic Publishers.

- Medrano, H, Tortosa, I., Montes, E., Pou, A., Balda, P., Bota, J. y Escalona, J. M. (2018). Genetic improvement of grapevine (*Vitis vinifera* L.) water use efficiency: variability among varieties and clones. Elsevier. 377-401.
- Miele, A., Carbonneau, A. y Bouard, J. (2000). Composition en acides aminés libres des feuilles et des baies du cépage Cabernet Sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 34 (1), 19-26.
- Miklós, E. y Kerényi, Z. (2004). Comparison of the volatile aroma components in noble rotted grape berries from two different locations of the Tokaj wine district in Hungary. *Analytical Chemical Acta*, 513, 177–181.
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.* 43(7), 1844–1855.
- Moio, L.; Ugliano, M., Genovese, A.; Gambuti, A.; Pessina, R. y Piombino, P. (2004). Effect of antioxidant protection of must on volatile compounds and aroma shelf life of Falanghina (*Vitis vinifera* L.) wine. *J. Agric. Food Chem.* 52 (4), 891–897.
- Monagas, M., Bartolomé, B. y Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 85–118.
- Monagas, M., Hernández-Ledesma, B., Gómez-Cordovés, C. y Bartolomé, B. (2006). Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: antioxidant and chemical characterization. *J. Agric. Food Chem.* 54(2), 319-327.
- Moreira, J.L. y Santos, L. (2005). Analysis of organic acids in wines by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Anal Bioanal Chem.* 382, 421-425.
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M. y Hashizume, K. (2007). Effect of high temperature on anthocyanin composition and transcription of flavonoid hydroxylase genes in ‘Pinot noir’ grapes (*Vitis vinifera*). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 82, 199–206.
- Morris, J.R. y Oldridge, T.L. (2002). Vineyard apparatus, system, and method for vineyard mechanization, in: U. Arkansas (Ed.), 6,374,538, U.S.

N

- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somgyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375–380.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2005). *Principios de Bioquímica* (4º ED.). Lehninger. Ed. Omega.
- Nieuwoudt, H., Prior, B., Pretorius, I., Manley, M. y Bauer, F. (2004). Principal component analysis applied to Fourier transform infrared spectroscopy for the design of calibration sets for glycerol prediction models in wine and for the detection and classification of outlier samples. *J. Agric. Food. Chem.* 52, 3726-3735.

Núñez, V., Monagas, M., Gomez Cordovés, M.C. y Bartolomé, B. (2004). *Vitis vinifera* L.cv. graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biology and Technology* 31, 69-79.

Nykänen, L. (1986). Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* 37 (1), 84–96.

O

OIV. (1990). *Recueil des Methodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts*. Paris: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin.

OIVE. (2017). Evolución mensual de los principals datos. Organización Interprofesional del vino en España.

Ojeda, H., Deloire, A. y Carbonneau, A. (2001). Influence of water deficits on grape berry growth. *Vitis* 40, 141-145.

Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., y Deloire, A. (2002). Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 261–267

Oliveira, C., Silva Ferreira, A.C., Mendes Pinto, M., Hogg, T., Alves, F. y Guedes de Pinho, P. (2003). Carotenoid compounds in grapes and their relationship to plant water status. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5967-5971.

Oliveira, J. M., Fari, M., Sa, F., Barros, F. y Araujo, I. M. (2006). C6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *Anal. Chem. Acta* 563, 300–309.

Oliveira, J.M., Oliveira, P., Baumes, R.L. y Maia, M.O. (2008). Changes in aromatic characteristics of Loureiro and Alvarinho wines during maturation. *J. Food Comp. Anal.* 21, 695–707.

Ortega-Heras M., Pérez-Magariño S., del Villar-Garrachón V., González-Huerta C., Moro González L.C., Guadarrama Rodríguez A., Villanueva Sánchez S., Gallo González R. y Martín de la Helguera S. (2014). Study of the effect of vintage, maturity degree, and irrigation on the amino acid and biogenic amine content of a white wine from the Verdejo variety. *J. Sci. Food Agric.* 94, 2073- 2082.

Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J.M., López-Roca, J.M. and Gómez-Plaza, E. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Anal Chim. Acta.* 563, 26–32.

Otero, I. (2015). Efecto del deshojado precoz sobre los componentes de la producción, la composición y calidad de la uva y el vino de la variedad *Vitis vinifera* L. Albariño. Tesis doctoral. Universidad de Vigo.

- Ou, C., Du, X., Shellie, K., Ross, C. y Qian, M.C. (2010). Volatile compounds and sensory attributes of wine from cv. Merlot (*Vitis vinifera* L.) grown under differential levels of water deficit with or without a kaolin-based foliar reflectant particle film. *J. Agric Food Chem.* 58, 12890-12898.
- Ough, C.S. y Bell, A.A. (1980). Effects of nitrogen fertilización of grapevines on aminoacid metabolisme and higher-alcohol formation during grape juice fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 31, 122-123.
- Ough, C.S. y Lee, T.H. (1981). Effect of vineyard nitrogen fertilization level on the formation of some fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 32, 125-127.
- Ough, C.S., Huang, Z., An, D. y Stevens, D. (1991). Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: Effects on urea excretion and reabsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 26-40.

P

- Palliotti, A., Cartechini, A., Possingham, J.V. y Neilsen, G.H. (2000). Cluster thinning effects on yield and grape composition in different grapevine cultivars. *Acta Hort.* No. 512, pp. 111-119.
- Palliotti, A., Silvestroni, O. y Petoumenou, D. (2010). Seasonal patterns of growth rate and morphophysiological features in green organs of Cabernet Sauvignon grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 61, 74–82.
- Pascual, M., Romero, M.P., Rufat J. y Villar, J.M. (2015). Canopy management in rainfed vineyards (cv. Tempranillo) for optimizing water use and enhancing wine quality. *J Sci Food Agric.* 95, 3067–3076.
- Pastor del Rio, J. y Kennedy, J.A. (2006). Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 125–132.
- Patrick, J.W., Zhang, W., Tyerman, S.D., Offler, C.E. y Walker, N.A. (2001). Role of membrane transport in phloem translocation of assimilates and water. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 695–707.
- Peacock, W.L., Christensen, L.P. y Hirschfelt, D.J. (1991). Influence of nitrogen fertilizer timing on grapevine in the San Joaquin valley. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 322–6.
- Pecket, R.C. y Samll, C.J. (1980). Ocurrance, location and development of anthocyanoplasts. *Phytochem.* 19, 2571-2576.
- Penman, H.L. (1948). Natural evaporation from open water, bare soil, and grass. *Proc. R. Soc. London Ser. A.* 193: 120– 146.

- Percival, D.C., Fisher, K.H. y Sullivan, J.A. (1994). Use of fruit zone leaf removal with *Vitis vinifera* L cv Riesling grapevines. 2. Effect on fruit composition, yield and occurrence of bunch rot (*Botrytis-cinerea* pers, Fr). *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 133-140.
- Pérez-Álvarez, E.P., Garde-Cerdán, T., García-Escudero, E. y Martínez-Vidaurre, J.M. (2017). Effect of two doses of urea foliar application on leaves and grape nitrogen composition during two vintages. *J. Sci. Food Agric.* 97, 2524-2532.
- Perez-Harvey, J. y Witting, D. (2001). Influence of soil nitrogen fertilization and artificial shading on the nitrogen and potassium levels in leaves and berries of Cabernet Sauvignon. *Proceedings of GESCO: Gestion de l' eau dans le vignoble. Montpellier, France. (AGRO: Montpellier, France)* pp. 355-361.
- Pérez-Magariño, S. y González-San José, M.L. (2004). Evolution of flavanols, anthocyanins and their derivatives during the aging of red wines, elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* 52:1181-1189.
- Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Loscos, N., Cacho, J., Ferreira, V. y Tomas, E. (2010) Estudio de la evolucion de precursores aromáticos glicosídicos y aminoácidos durante la maduración de uvas de la variedad Tempranillo en dos D.O. distintas, in VII Foro Mundial del Vino. Logrono, Spain.
- Petrie, P.R., Trought, M.C.T. y Howell G.S. (2000). Influence of leaf ageing, leaf area and crop load on photosynthesis, stomatal conductance and senescence of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. *Vitis* 39, 31-36.
- Petrie, C. S. y Clingeleffer, P.R. (2006). Crop thinning (hand versus mechanical), grape maturity and anthocyanin concentration: Outcomes from irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) in a warm climate. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 21–29.
- Peyrot Des Gachons, C. y Kennedy, J.A. (2003). Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5877-5881.
- Picón-Toro, J., González-Dugo, V., Uriarte, D., Mancha, L. y Testi, L. (2012). Effects of canopy size and water stress over the crop coefficient of a “Tempranillo” vineyard in south-western Spain. *Irrigation Sci.* 30, 419-432.
- Poni, S., Bernizzoni, F., Presunto, P. y Rebutti, B. (2004). Performance of Croatina under short-cane mechanical hedging: A successful case of adaptation. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 379-388.
- Poni, S., Bernizzoni, F., Briola, G. y Cenni, A. (2005). Effects of early leaf removal on cluster morphology, shoot efficiency and grape quality in two *Vitis vinifera* cultivars. *Proc. Seventh Int. Symp. on Grapevine Physiology and Biotechnology*, pp. 217–225.

- Poni, S., Casalini, L., Bernizzoni, F., Civardi, S. y Intrieri, C. (2006). Effects of early defoliation on shoot photosynthesis, yield components, and grape composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 397-407.
- Poni, S., Bernizzoni, F., Civardi, S. y Libelli, N. (2009). Effects of pre-bloom leaf removal on growth of berry tissues and must composition in two red *Vitis vinifera* L. cultivars. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15, 185-193.
- Poni, S. y Bernizzoni, F. (2010). A three-year study on the impact of pre-flowering leaf removal on berry growth components and grape composition in cv. Barbera vines. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 44, 21-30.
- Poni, S., Gatti, M., Bernizzoni, F., Civardi, S., Bobeica, N., Magnanini, E. y Palliotti, A. (2013). Late leaf removal aimed at delaying ripening in cv. Sangiovese: Physiological assessment and vine performance. *Aust. J. Grape Wine Res.* 19, 378-387.
- Pool, R.M., Pratt, C. y Hubbard, H.D. (1978). Structure of base buds in relation to yield of grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 29, 36-41.
- Possner, D.R.E. y Kliwer, W.M. (1985). The localisation of acids sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis.* 24, 229-240.
- Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M. y Watson, B.T. (1995). Cluster sun exposure and quercetin in pinot-noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 187-194.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V. y Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochem.* 36, 781-784.
- Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Bertrand, A. y Maujean, A. (2000). Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3761-3766.
- Procopio, S., Krause, D., Hofmann T. y Becker, T. (2013). Significant amino acids in aroma compound profiling during yeast fermentation analyzed by PLS regression. *LWT-Food Sci. Technol.* 51(2), 423-432.

Q

- Quinlan, J.D. y Weaver, J.R. (1970). Modification of pattern of photosynthate movement within and between shoots of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiol.* 46, 527-530.

R

- Ramey, D.D., Bertrand, A., Ough, C.S., Singleton, V.L. y Sanders, E. (1986). Effects of skin contact temperature on Chardonnay must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 37 (2), 99-106.

- Rapp, A. y Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia* 42, 873–884.
- Rapp, A. y Versini, G. (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. In: *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*, George Charalambous (Ed.), 8th International Flavor Conference, Cos, Greece, 6-8 July 1994, Elsevier, pp. 1659–1694.
- Rapp, A. y Versini, G. (1996) Influence of nitrogen on compounds in grapes on aroma compounds in wines. *J. Int. Sci. Vigne Vin*. 51, 193–203.
- Razungles, A.J., Günata, Z., Pinatel, S., Baumes, R. y Bayonove, C.L. (1993). Étude quantitative de composés terpéniques, norisoprenoïdes et de leurs précurseurs dans diverses variétés de raisins. *Sci. Aliments* 13, 59-72.
- Revilla, E., García-Benítez, E. y Cabello, F. (2009). Anthocyanin fingerprint of clones of Tempranillo grapes and wines made with them. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15, 70-78.
- Reynolds, A.G. y Wardle, D.A. (1989a). Impact of various canopy manipulation techniques on growth, yield, fruit composition and wine quality of Gewürztraminer. *Am. J. Enol. Vitic.* 40 (2), 121-129.
- Reynolds, A.G. y Wardle, D.A. (1989b). Influence of fruit microclimate on monoterpene levels of Gewurztraminer. *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 149–154.
- Reynolds, A.G., Wardle, D.A. y Dever, M. (1994). Shoot density effects on Riesling grapevines: Interactions with cordon age. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 435-443.
- Reynolds, A.G., Wardle, D.A. y Naylor, A.P. (1996). Impact of training system, vine spacing, and basal leaf removal on Riesling. Vine performance, berry composition, canopy microclimate, and vineyard labor requirements. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 63-76.
- Reynolds, A.G., Molek, T. y De Savigny, C. (2005). Timing of shoot thinning in *Vitis vinifera*: Impacts on yield and fruit composition variables. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 343-356.
- Reynolds, A.G., Schlosser, J., Power, R., Roberts, R., Willwerth, J. y de Savigny, C. (2007). Magnitude and interaction of viticultural and enological effects. I. Impact of canopy management and yeast strain on sensory and chemical composition of Chardonnay Musqué. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 12-24.
- Ribéreau-Gayon, P. (1964). Les composés phénoliques du raisin et du vin II. Les flavonosides et les anthocyanosides. *Ann. Physiol. Veg.* 6, 211-242.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. y Dubordieu, D. (2006). Phenolic compounds. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubordieu, D., eds. *Handbook of enology. The chemistry of wine stabilisation and treatments* (John Wiley & Sons: Chichester, England).

- Riou, C. (1994). Le Déterminisme Climatique de la Maturation du Raisin: Application au Zonage de la Teneur en Sucre dans la Communauté Européenne (Rapport No. EUR-15863). Commission Européenne, Luxembourg.
- Risco, D., Pérez, D., Yeves, A., Castel, J.R. y Intrigliolo, D.S. (2014). Early defoliation in a temperate warm and semi-arid Tempranillo vineyard: Vine performance and grape composition. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20, 111-122.
- Ristic, R., Pinchbeck, K.A., Fudge, A.L., Hayasaka, Y. y Wilkinson, K.L. (2013). Effect of leaf removal and grapevine smoke exposure on colour, chemical composition and sensory properties of Chardonnay wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 19, 230–237.
- Robinson, S. P. y Davies, C. (2000). Molecular biology of grape berry ripening. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6(2), 175–188.
- Roby, G., Harbertson, J.F., Adams, D.A. y Matthews, M.A. (2004). Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: anthocyanins and tannins. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10, 100–107.
- Romano, P. y Suzzi, G. (1993). Acetoin production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 108(1), 23–26.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., and Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavor. *Int J Food Microbiol.* 86(1–2), 169–180.
- Romero, P., Fernández-Fernández, J. I. y Martínez-Cutillas, A. (2010). Physiological thresholds for efficient regulated deficit-irrigation management in winegrapes grown under semiarid conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 61(3), 300–312.
- Romeyer, F.M., Macheix, J.J., Goiffon, J.P., Reminiac, C.C. y Sapis, J.C. (1983). The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *J. Agric. Food Chem.* 31, 346-349.
- Ruffner, H.P. (1982). Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: A review, Part B, *Vitis* 21: 346-358.
- Rustioni, L., Bedgood, D.R., Failla, O., Prenzler, P.D. y Robards, K. (2012). Copigmentation and anti-copigmentation in grape extracts studied by spectrophotometry and post-column-reaction HPLC. *Food Chem.* 132, 2194-2201.
- Ryan, J. M. y Revilla, E. (2003). Anthocyanin composition of Cabernet sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3372–3378

S

- Sabbatini, P. y Howell, S.G. (2010). Effects of early defoliation on yield, fruit composition, and harvest season cluster rot complex of grapevines. *HortScience* 45, 1804–1808.

- Sacchi, K.L., Bisson, L.F. y Adams, D.O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 56,197-206.
- Sadras, V.O., Moran, M.A. y Bonada, M. (2013). Effects of elevated temperature in grapevine. I. Berry sensory traits. *Aust. J. Grape Wine Res.* 19, 95-106.
- Saint-Cricq, N., Augustin, M., Vivas, N. y Glories, Y. (1997). A biochemical approach to the evolution of procyanidins in grape seeds during the ripening of red grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Merlot Noir). *Journal of Wine Research* 8, 159–167.
- Saint-Criq, N., Vivas, N. y Glories, Y. (1999). Maduración fenólica de las uvas tintas. Relación con la calidad de los vinos. Comparación entre los vidueños Merlot y Tempranillo. *Sevi.* N° 2748, 1047 – 1051, 1126–136.
- Salvi, L., Cataldo, E. y Mattiia, G. B. (2017). Leaf removal and cluster thinning trials in ‘Foglia Tonda’ grapevine. In *Acta Horticulturae* (Vol. 1188, pp. 105–112). International Society for Horticultural Science.
- Sánchez Lorenzo, A. (2009). Climatología y evolución espacio-temporal de la nubosidad e insolación en la Península Ibérica desde mediados del siglo XX. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- Santesteban, L.G. y Royo, J.B. (2006). Water status, leaf area and fruit load influence on berry weight and sugar accumulation of cv. ‘Tempranillo’ under semiarid conditions. *Sci. Hortic.* 109:60-65.
- Shackel, K. A., Ahmadi, H., Biasi, W., Buchner, R., Goldhamer, D., Gurusinghe, S., Ahmadi, H., Biasi, W., Buchner, R., Goldhamer, D., Gurusinghe, S., Hasey, J., Kester, D., Krueger, B., Lampinen, B., McGourty, G., Micke, W., Mitcham, E., Olson, B., Pelletrau, K., Philips, H., Ramos, D., Schwankl, L., Sibbett, S., Snyder, R., Southwick, S., Stevenson, M., Thorpe, M., Weinbaum, S. y Yeager, J. (1997). Plant water status as an index of irrigation need in deciduous fruit trees. *Hort.Technology* 7(1), 23-29.
- Sharma, K., Sharma, S. y Lahiri, S. (2009). Novel method for identification and quantification of methanol and ethanol in alcoholic beverages by gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy and horizontal attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. *J AOAC Int.* 92, 518-526.
- Sarneckis, C.J., Dambergs, R.G., Jones, P., Mercurio, M., Herdewrich, M.J. y Smith, P.A. (2006). Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cel- lulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 39–49.
- Sarrazin, E., Dubourdieu, D. y Darriet, P. (2007). Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chem.* 103, 536–545.

- Schneider, R., Razungles, A., Charrier, F. y Baumes, R. (2002). The effect of the site, maturity and lighting of grape bunches on the aromatic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. berries in Muscadet vineyards. *Bull. OIV* 75:269-282.
- Schwarz, M., Wabnitz, T.C. y Winterhalter, P. (2003). Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3682-3687.
- Schwarz, M., Picazo-Bacete, J. J., Winterhalter, P. y Hermosín-Gutiérrez, I. (2005). Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments. *J. Agric. Food Chem.* 53(21), 8372–8381.
- Sefton, M.A., Francis, I.L. y Williams, P.J. (1993). The volatile composition of Chardonnay juices: A study by flavor precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 44 (4), 359–369.
- Seguin, B. y de Cortazar, I.G. (2005). Climate warming: Consequences for viticulture and the notion of ‘terroirs’ in Europe. *Acta Hort* 689: 61–69.
- Simpson, R.F. (1978). Aroma and compositional changes in wine with oxidation, storage and aging. *Vitis*. 17:274-287.
- Shinohara, T. (1984). L’importance des substances volatiles du vin. Formation et effets sur la qualité. *Bull. O.I.V.* 641/642, 606-618
- Shinohara, T. (1985). Gas chromatographic analysis of volatile fatty acids in wines. *Agric Biol Chem*, 49, 2211-2212.
- Singleton, V.L. y Esau, P. (1968). Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. *Advances in food research*. Supplement 1, 1-261.
- Skinkis, P., Bordelon, B. y Butz, E. (2010). Effects of sunlight exposure on berry and wine monoterpenes and sensory characteristics of Taminette. *Aust. J. Grape Wine Res.* 61, 147–156.
- Smart, R. (1985). Principles of grapevine canopy microclimate manipulation with implications for yield and quality. *Aust. J. Grape Wine Res.* 36, 230–239.
- Smart, R.E., Smith, S.M. y Winchester, R.V. (1988). Light quality and quantity effects on fruit ripening for Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 250-8.
- Smart, R.E., Robinson, J.B., Due, G.R. y Brien, C.J. (1985). Canopy microclimate modification for the cultivar Shiraz. I Definition of canopy microclimate. *Vitis* 24, 17–31.
- Smart, R. y Robinson, M. (1991). *Sunlight into Wine: A Handbook for Winegrape Canopy Management*. Winetitles, Adelaide, Australia.

- Soto, E., Río, S. y Orriols, I. (2010). Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. *Eur Food Res Technol.* 231, 789–802.
- Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossaud, F. y Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochem.* 43, 509–512.
- Spayd, S.E., Wample, R.L., Evans, R.G., Stevens, R.G., Seymour B.J. y Nagel, C.W. (1994). Nitrogen fertilization of White Riesling grapes in Washington. Must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 34-42.
- Spayd, S.E. y Andersen-Bagge, J. (1996). Free amino acid composition of grape juice from 12 *Vitis vinifera* cultivars in Washington. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 389–402.
- Spayd, S.E., Tarara, J.M., Mee, D.L. y Ferguson, J.C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 171-182.
- Spring, J.L. (2001). Influence du type d'enherbement sur le component de la vigne et qualité des vins. Résultats d'un essai sur Chasselas dans le bassin lémanique. 1. Résultats agronomiques. *Revue Suisse Viticulture, Arboriculture et Horticulture.* 33, 253-260.
- Steinke, R.D. y Paulson, M.C. (1964). Phenols from grain, production of steam-volatile phenols during cooking and alcoholic fermentation of grain. *J. Agric. Food Chem.* 12, 381-387.
- Sternad Lemut, M., Trost, K., Sivilotti, P. y Vrhovsek, U. (2011). Pinot Noir grape colour related phenolics as affected by leaf removal treatments in the Vipava Valley. *J. Food Comp. Anal.* 24, 777–784.
- Sternad Lemut, M., Sivilotti, P., Franceschi, P., Wehrens, R. y Vrhovsek, U. (2013). Use of metabolic profiling to study grape skin polyphenol behavior as a result of canopy microclimate manipulation in a 'Pinot noir' vineyard. *J. Agric. Food Chem.* 61, 8976-8986.
- Stines, A.P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P.A., Høj, P.B. y van Heeswijk, R. (2000). Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 150–158.
- Su, T. y Singleton, V.L. (1969). Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochem.* 8, 1553-1558.
- Suárez, C., Palacios, A., Santiago, L., Santamaría, P., López, R. y Gutiérrez, A. R. (2003). Efecto del uso de levaduras inactivas en las paradas de fermentación. Influencia de los ácidos grasos en el desarrollo de la fermentación alcohólica. *SEVI.* (2990), 4134-4140.
- Šuklje, K., Antalick, G., Coetzee, Z., Schmidtke, L.M., Baša, H., Ešnik, C., Brandt, J., du Toit, W.J., Lisjak K. y Deloire, A. (2016a). Effect of leaf removal and ultraviolet radiation on

the composition and sensory perception of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20, 223–233, 2014.

Šuklje, K., Antalick, G., Buica, A., Langlois, J., Coetzee, Z.A, Gouot, J., Schmidtke, L.M. y Deloire, A. (2016b). Clonal differences and impact of defoliation on Sauvignon blanc (*Vitis vinifera* L.) wines: a chemical and sensory investigation. *J. Sci. Food Agric.* 96, 915–926.

Sun, B.S., Santos, C.P.R., Leandro, M.C., De Freitas, V. y Spranger, M.I. (2007). High-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of new products formed by the reaction between flavanols and malvidin-3-glucoside in the presence of acetaldehyde. *Rapid Communication Mass Spectrometry*, 21, 2227–2236.

Sun, Q., Sacks, G., Lech, S. y Vander Heuvel, J.E. (2011). Impact of shoot thinning and harvest date on yield components, fruit composition, and wine quality of Marechal Foch. *Am. J. Enol. Vitic.* 62, 32-41.

Sun, Q., Sacks, G., Lech, S. y Vander Heuvel, J.E. (2012). Impact of shoot and cluster thinning on yield fruit composition, and wine quality of Corot noir. *Am. J. Enol. Vitic.* 63 (1), 49-56.

T

Talaverano, I., Valdés, E., Moreno, D., Gamero, E., Mancha, L. y Vilanova, M. (2016). The combined effect of water status and crop level on Tempranillo wine volatiles. *Journal of the J. Sci. Food Agric.* 97(5), 1533–1542.

Talaverano, M.I. (2017). Mejora de la calidad de uvas y vinos en Extremadura mediante técnicas vitícolas. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.

Tarara, J.M., Lee, J., Spayd, S.E. y Scagel, C.F. (2008). Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in merlot grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 59, 235-247.

Tardáguila, J., Njegovan, M., Downey, M. y Kristic, M. (2005). Determining the effect on bunch thinning of Sangiovese and Grenache composition. In *Proceedings International Workshop on Advances in Grapevine and Wine Research*. Venosa, Italy, pp. 194.

Tardáguila, J., Diago, M.P., Martinez de Toda, F., Poni, S. y Vilanova, M. (2008). Effects of timing of leaf removal on yield, berry maturity, wine composition and sensory properties of cv. Grenache grown under non irrigated conditions. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 42, 211–229.

Tardáguila, J., Martinez de Toda, F., Poni, S. y Diago, M.P. (2010). Impact of early leaf removal on yield and fruit and wine composition of *Vitis vinifera* L. Graciano and Carignan. *Am. J. Enol. Vitic.* 61, 372–381.

- Tardáguila, J., Blanco, J.A., Poni, S. y Diago, M.P. (2012). Mechanical yield regulation in winegrapes: Comparison of early defoliation and crop thinning. *Aust. J. Grape Wine Res.* 18, 344-352.
- Tessarín, P., Boliani, A.C., Botelho, R.V., Rusin, C., Versari, A., Parpinello, G.P. y Rombolà, A.D. (2014). Effects of late defoliations on chemical and sensory characteristics of cv. Uva Longanesi wines. *J. Soil Sci. Plant Nutrition* 14 (4), 1021-1038.
- Tominaga, T., Peyrot Des Gachons, C. y Dubourdieu, D. (1998). A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5215-5219.
- Tominaga, T., Guimbertau, G. y Dubourdieu, D. (2003). Role of Certain Volatile Thiols in the Bouquet of Aged Champagne Wines. *J. Agric. Food Chem.* 51 (4), 1016-1020.
- Tonietto, J. y Cabonneau, A. (2004). A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. *Agric. Forest Meteorol.* 124, 81-97.
- Torchio, F., Giacosa, S., Vilanova, M., Río, S., Gerbi, V. y Rolle, L. (2016). Use of the response surface methodology for the assessment of changes in the volatile composition of Moscato Bianco (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Food Chem.* 212, 576–584.
- Tregoat, O., Van Leeuwen, C., Choné, X. y Gaudillère, J. P. (2002). Étude du régime hydrique et de la nutrition azotée de la vigne par des indicateurs physiologiques influence sur le comportement de la vigne et la maturation du raisin (*Vitis vinifera* L. cv Merlot, 2000, bordeaux). *J. Int. Sci. Vigne Vin* 36(3), 133–142.
- Trioli, G. y Paronetto, L. (1992). Relazioni tra Componenti Azotate dei Mosti e Qualità dei Vini. *Vignevini.* 1/2, 29-36.

U

- Uriarte, D., Picón, J., Mancha, L.A., Blanco, J., Prieto, M.H., Moreno, D., Gamero, E., Valdés, E., Risco, D., Castel, J.R. y Intrigliolo, D.S. (2012). Early defoliation of 'Tempranillo' grapevines in semi-arid terroirs of Spain. *Acta Hort. (ISHS)* 931, 299-306.
- Uriarte, D. (2016). Efectos del riego y el aclareo de racimos sobre el comportamiento de cv. Tempranillo en condiciones de clima semi-árido. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
- U.S.D.A. (United States Department of Agriculture, Soil Survey Staff), 1992. Keys to soil taxonomy. In: *SMSS Technical Monograph 19*. Pocahontas Press, Blacksburg, Va. 541.
- Usseglio-Tomasset, L. (1983). Influence de la température de conservation sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des vins (vins aromatiques). *Bulletin de l'OIV* 623, 19–34.

V

- Valdés, E., Moreno, D., Gamero, E., Uriarte, D., Prieto, M.H., Picón J., Manzano, R. y Intrigliolo, D. (2009). Effects of cluster thinning and irrigation amount on water relations, growth, yield and fruit and wine composition of Tempranillo grapes in Extremadura, Spain. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 67-76.
- Valdés, E., Vilanova, M., Sabio, E. y Bernalte, M. J. (2011). Clarifying agents effect on the nitrogen composition in must and wine during fermentation. *Food Chem.* 125, 2, 430-437.
- Valdés, E., Prieto, M.H., Moreno, D., Gamero, E., Montoro, A., Mañas, F., López-Urrea, R., López-Fuster, P., Yuste, J., Albuquerque, M.V., Yuste, J.R., Barajas, E., Yeves, A., Pérez, D., Intrigliolo, D. y Castel, J.R. (2012). Terroir effects on the response of Tempranillo grapevines to irrigation in four locations of Spain: grape and must composition. *IXe International Terroirs Congress.* 6, 11-13.
- Valdés, E., Vilanova, M., Moreno, D., Talaverano, I., Gamero, E., Uriarte, D., Yuste, J., Montoro, A. y Castel, J.R. (2015). Perfil amínico de cuatro variedades blancas (*Vitis vinifera* L.) cultivadas en España: Airén, Cigüente, Moscatel de Alejandría y Verdejo. *SEVI*, 2047-2055.
- Valdés, M.E. Talaverano, M.I., Moreno, D., Prieto, M.H., Mancha L.A., Uriarte, D., Vilanova, M. (2019). Effect of the timing of water deficit on the must amino acid profile of Tempranillo grapes grown under the semiarid conditions of SW Spain. *Food Chem.* 292, 24-31.
- Valero, E., Millán, C., Ortega, J.M. y Mauricio, J.C. (2003). Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Sci. Food Agric.* 83(8), 830–835.
- Van Leeuwen, C., Friant, P., Chone, X., Tregoat, O., Koundouras, S. y Dubourdieu, D. (2004). Influence of climate, soil, and cultivar on terroir. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 207–217.
- Vasconcelos, M.C. y Castagnoli, S. (2000). Leaf canopy structure and vine performance. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 390–396.
- Venencie, C., Uveira, M.N. y Guet, S. (1997). Maturité polyphénolique du raisin mise en place d’une méthode d’analyse de routine. *Rev. Fr. Oenologie* 167, 36-41.
- Venencie, C., Videau, B. y Michel, D. (1998). Contrôle maturité: analyse des pellicules ou des baies entières?. *Rev. Fr. Oenologie.* 169, 13-15.
- Verdenal, T., Zufferey, V., Dienes-Nagy, A., Gindro, K., Belcher, S., Lorenzini, F. y Viret, O. (2017). Pre-flowering defoliation affects berry structure and enhances wine sensory parameters. *OENO One*, 51(2).

- Versari, A., Boulton, R. y Thorngate J. (2004). The prediction of the color components of red wines using FTIR, wine analyses, and the method of Partial Least Squares. ACS Symposium Series: 886, 53-67.
- Versini, G., Inama, S. y Sartori, G. (1981). A capillary column gaschromatographic research into the terpene constituents of Riesling Renano wine from Trentino Alto Adige: their distribution within berry, their passage into must and their presence in the wine according to different wine-making procedures. Organoleptic considerations. Vini d'Italia XXIII: 189–211.
- Verzena, A., Tripodi, G., Dima, G., Condurso, C., Scacco, A., Cincotta, F. y Sparacio, A. (2016). Leaf removal and wine composition of *Vitis vinifera* L. cv. Nero d'Avola: The volatile aroma constituents. J. Sci. Food Agric. 96(1), 150–159.
- Vidal-Aragón, M.C., Moreno, D., Gamero, E., Prieto, M.H. y Valdés, M.E. (2009). Metodologías para la evaluación de la madurez de la uva: Revisión. La problemática de la determinación del estado de madurez fenólica de la uva. Revisión de las metodologías propuestas para su evaluación. XXXI Jornadas de viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (España), 201-214.
- Vilanova, M., Zamuz, S., Vilariño, F. y Sieiro, C. (2007). Effect of terroir on the volatiles of *Vitis vinifera* cv. Albariño. J. Sci. Food Agric. 87, 1252-1256.
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S. y Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and nonvolatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77(1), 145–157.
- Vilanova, M., Genisheva, Z., Bescansa, L., Masa, A. y Oliveira, J.M. (2009). Volatile composition of wines from *Vitis vinifera* Agudelo, Serradelo and Blanco lexítimo from Betanzos (NW Spain). Journal of the Institute of Brewing 115, 35–40.
- Vilanova, M., Genisheva, Z., Masa, A. y Oliveira, J. M. (2010). Correlation between volatile composition and sensory properties in spanish Albariño wines. Microchem. J. 95(2), 240–246.
- Vilanova, M., Siebert, T., Varela, C., Pretorius, I.S. y Henschke, P.A. (2012a). Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. Food Chem. 133, 124-131.
- Vilanova, M., Genisheva, Z., Bescansa, L., Masa, A. y Oliveira, J.M. (2012b). Changes in free and bound fractions of aroma compounds of four *Vitis vinifera* cultivars at the last ripening stages. Phytochem. 74, 196–205.
- Vilanova, M., Diago, M. P., Genisheva, Z., Oliveira, J.M. y Tardaguila, J. (2012c). Early leaf removal impact on volatile composition of Tempranillo wines. J. Sci. Food Agric. 92, 935–942.

- Vilanova, M., Campo, E., Escudero, A., Graña, M., Masa, A. y Cacho J. (2012d). Volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* red cultivars from North West Spain: Correlation between sensory and instrumental analysis. *Anal. Chim. Acta* 720(30), 104-111.
- Vilanova, M., Genisheva, Z., Graña, M. y Oliveira, J.M. (2013). Determination of odorants in varietal wines from international grape cultivars (*Vitis vinifera*) grown in NW Spain. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 34, 212-222.
- Vilanova, M., Rodríguez, I., Canosa, P., Otero, I., Gamero, E., Moreno, D. y Valdés, E. (2015). Variability in chemical composition of *Vitis vinifera* cv Mencía from different geographic areas and vintages in Ribeira Sacra (NW Spain). *Food Chem.* 169(15), 187–196.
- Vilanova, M., Rodríguez-Nogales, J.M., Vila-Crespo, J. y Yuste J. (2018). Influence of water regime on yield components, must chemicals and wine volatiles of cv. Verdejo. *Aust. J. Grape Wine Res.* 25, 83-91.
- Vilanova, M., Fandiño, M., Frutos, S. y Cancela J. (2019). Assessment fertigation effects on volatile and non-volatile compounds in *Vitis vinifera* Albariño. *Food Chem.* 278, 636-643.
- Vos, P.J.A. y Gray, R.S. (1979). The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 187–197.

W

- Walker, R.R., Clingeleffer, P.R., Kerridge, G.H., Rühl, E.H., Nicholas, P.R. y Blackmore, D.H. (1998). Effects of the rootstock Ramsey (*Vitis champini*) on ion and organic acid composition of grapes and wine, and on wine spectral characteristics. *Aust. J. Grape Wine Res.* 4, 100–110.
- Weaver, R.J. (1960). Toxicity of gibberellin to seedless and seeded varieties of *Vitis vinifera*. *Nature* 187, 1135-1136.
- Webb, L.B., Whetton, P.H. y Barlow E.W.R. (2008). Climate change and winegrape quality in Australia. *Clim. Res.* 36, 99–111.
- Williams, P.J., Sefton, M.A. y Wilson, B. (1989). Non-volatile conjugated of secondary metabolites as precursors of varietal grape flavor components. In *Flavor Chemistry Trends and Developments*. R. Teranishi et al. (eds.), pp. 35-48. Am. Chemical Society, Washington, DC.
- Williams, L. E. y Araujo, F. J. (2002). Correlations among predawn leaf, midday leaf, and midday stem water potential and their correlations with other measures of soil and plant water status in *Vitis vinifera*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127(3), 448–454.
- Winkler, J. (1965). *Viticultura*. Compañía Editorial Continental S.A. México. pp 792.

Winkler, A.J., Cook, J.A., Kliewer, W.M. y Lider, L.A. (1974). General viticulture revised and enlarged edition. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.

Winkler, A.J. (1978). Viticultura. Compañía. Ed. Continental, S.A. México.

Winterhalter, P. y Skouroumounis, G.K. (1997). Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, role and biotechnological transformation. In Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. T. Scheper (ed.), pp. 74-105. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin.

Y

Yokutsuka, K., Nagao, A., Nakazawa, K. y Sato, M. (1999). Changes in anthocyanins in berry skins of Merlot and cabernet Sauvignon grapes grown in two soils modified with limestone or oyster shell versus a native soil over two years. Am. J. Enol. Vitic. 50, 1-2.

Z

Zheng, W., García, J., Balda, P. y Martínez de Toda, F. (2017). Does full exposure of clusters have any negative effects on tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape quality in La Rioja, Spain? The use of severe cluster-zone leaf removal after berry set. S. Afr. J. Enol. Vitic. 38, 228–236.

Zoecklein, B.W., Wolf, T.K., Marcy, J.E. y Jasinski, Y. (1998). Effect of fruit zone leaf thinning on total glycosides and selected aglycone concentrations of Riesling (*Vitis vinifera* L.) grapes. Am. J. Enol. Vitic. 49, 35–46.

7

ANEXOS

Effects of Preflowering Leaf Removal on Phenolic Composition of Tempranillo in the Semiarid Terroir of Western Spain

Daniel Moreno,¹ Mar Vilanova,^{2*} Esther Gamero,¹ Diego S. Intrigliolo,³ M. Inmaculada Talaverano,¹ David Uriarte,⁴ and M. Esperanza Valdés¹

Abstract: The effects of preflowering defoliation on the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds in the grape skins of Tempranillo grapevines grown in a semiarid terroir of western Spain, Badajoz, were determined. Control vines were compared with defoliation carried out before flowering (ED) in 2009 and 2010. Forty-two phenolic compounds were identified and quantified in the grape skins, including anthocyanins, flavonols, flavanols (catechin and epi-catechin and the flavanol dimmers *B1*, *B2*, and *B3*), and hydroxycinnamic acids, as both simple and conjugated molecules. ED did not significantly alter the concentration of total anthocyanidins, although in 2009, 3-*O*-acylated monoglucosides and *p*-coumaroylglucoside forms were more abundant in this treatment. A nonsignificant tendency toward increased total flavanols due to defoliation treatment was observed. Leaf removal increased concentrations of flavonols (glycosides of myricetin, quercetin, kaempferol, and isorhamnetin), hydroxycinnamic acids, and stilbenes in season-specific ways. Preflowering leaf removal may contribute to increased concentrations of compounds that can form complexes with anthocyanins (copigments) and may thus improve wine color stability.

Key words: defoliation, copigmentation, phenolic compounds, *Vitis vinifera* L.

Color is an important factor in determining red wine quality. Wine color is linked to the accumulation of anthocyanins in the grape berries and particularly in the skin. However, it is not only the anthocyanin concentration and profile that is responsible for wine color: copigmentation can account for 30 to 50% of color in young wines (Boulton 2001). Copigmentation in wine results from molecular interactions between anthocyanic pigments and other organic molecules, called cofactors, which form molecular associations or complexes. For copigmentation in young wines to increase, there must be sufficient quantities of substances that can act as copigments. The most common cofactors are compounds such as phenolic acids, flavonoids, and in particular, flavonol and flavone derivatives (Rustioni et al. 2012). Good quality grapes should have high concentrations of both stable pigments and

substances that can act as cofactors. Several agronomic techniques have been used to improve the quality and quantity of the phenolic compounds in berries. Early defoliation, manual or mechanical, can be a useful tool to reduce vine yield and improve fruit composition. Crop regulation is achieved in early defoliated vines through reduced fruit set, leading to smaller and looser clusters, and the canopy microclimate is improved by increasing fruit exposure and canopy porosity (Tardáguila et al. 2010), with substantial benefits in pigmentation and tolerance to rot (Intrieri et al. 2008). Phenolic compounds belong to an important group of pigments widely distributed throughout the plant kingdom. These compounds include flavonoids (anthocyanins, flavonols, and flavanols) and nonflavonoids (hydroxycinnamic acids and stilbenes) and have been described as important indicators of grape quality (Downey et al. 2004). Because different phenolic compounds are not synthesized at the same developmental stage, timing of defoliation may affect different aspects of berry composition differently (Sternad Lemut et al. 2013). As with other canopy management practices, the results of leaf removal are influenced by timing (Gatti et al. 2012, Sternad Lemut et al. 2013), severity (Risco et al. 2014), cultivar (Lee and Skinkis 2013), other specific variables such as choice of leaves removed/retained, and also by the climate of the area in general and the particular season. Prebloom leaf removal reduced yield in Sangiovese vines and increased sugar, total phenolics, and anthocyanin concentrations (Gatti et al. 2012), possibly due to changes in microclimate conditions in the cluster area (Sternad Lemut et al. 2013).

The purpose of this study was to evaluate the effects of early defoliation on grape skin phenolic composition in Tempranillo grapes grown in a semiarid terroir of Spain in two

¹CICYTEX, Technological Institute of Food and Agriculture (INTAEX), (Government of Extremadura), Av. Adolfo Suárez, s/n 06071 Badajoz, Spain; ²Misión Biológica de Galicia (CSIC), P.O. Box 28, 38080 Pontevedra, Spain; ³Instituto Valenciano Investigaciones Agrarias (IVIA), Sustainable Agriculture Center, P.O. Box 46113, Moncada, Valencia, Spain; and ⁴CICYTEX-Agricultural Research Center Finca La Orden-Valdesequera, (Government of Extremadura), Crta. A-V, Km 372, 06187 Badajoz, Spain.

*Corresponding author (mvilanova@mbg.csic.es)

Acknowledgments: This research was supported by funds from INIA-FEDER RTA2008-0037 and GOBEX GR10006. D. Moreno is grateful to the Extremadura Government and European Regional Development Fund (ERDF).

Manuscript submitted Jul 2014, revised Oct 2014, accepted Nov 2014

Publication costs of this article defrayed in part by page fees.

Copyright © 2015 by the American Society for Enology and Viticulture. All rights reserved.

doi: 10.5344/ajev.2014.14087

consecutive years, 2009 and 2010. Special attention was paid to the concentrations of monomeric anthocyanins and other compounds implicated in the formation of copigmentation complex cofactors such as flavonols, epicatechin, and hydroxycinnamic acids.

Materials and Methods

Plant material and experimental layout. The experiment was carried out in 2009 and 2010 in Badajoz, Extremadura (western Spain) (lat. 38°51'N; long. 6°40'W; elevation 198 m asl), in a Tempranillo vineyard (*Vitis vinifera* L.). Vines on rootstock 110R were planted in 2001 and trained to a vertical trellis on a bilateral cordon system oriented east-west. Vines were spaced 1.20 m within the row and 2.50 m between rows. Soil was loam to sandy-loam texture and >2 m deep. Drip irrigation was based on replacing 100% of crop evapotranspiration. Water consumption was calculated with a weighing lysimeter installed in the experimental vineyard. By the end of the season, the total applied irrigation was 666 and 597 mm in 2009 and 2010, respectively. The climate is continental semiarid and annual rainfall is 351 mm, of which ~70% falls during dormancy. A randomized block design was set up with each treatment replicated across four blocks consisting of six rows with 18 vines per row. Defoliated (ED) vines had the first seven basal leaves from each shoot removed before flowering, and were compared with a nondefoliated control (C). In 2010, the main leaves of secondary shoots were also removed from ED vines.

Environmental conditions. Climatic conditions were measured by an automatic meteorological station (CR10X datalogger; Campbell Scientific, Shepshed, UK) located in the vineyard. Thermal integral was calculated as the accumulation of maximum daily temperature above 10°C. Maximum, minimum, and mean temperatures and rainfall were calculated from April 1 to September 30. Three climate indices related to water balance and thermal conditions were calculated: heliothermal index (HI, Huglin 1978), cool night index (CI, Tonietto and Carbonneau 2004), and dryness index (DI, Riou 1994).

Agronomic and must determinations. The leaf area (LA) removed was estimated based on allometric relationships between shoot length and LA. At the end of vegetative growth, vine vigor was estimated using a plant canopy analyzer (LAI-2000; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) as described (Uriarte et al. 2012). Bloom stage was estimated from photographs of four clusters per vine for each experimental unit as described (Poni et al. 2006). Photographs were taken perpendicular to the cluster on a dark background just before anthesis and a linear regression between actual number of flowers and flowers counted in the digital photographs was used. At harvest, fruit set was estimated in the four selected clusters by counting the number of berries per cluster (Uriarte et al. 2012).

All samples were harvested at 23 to 24 Brix, a common harvesting criterion for Tempranillo in this area. In both seasons, the treatments were handharvested on different dates (20 Aug and 01 Sept, respectively, for ED and C in 2009; 31

Aug and 13 Sept, respectively, for ED and C in 2010). Yield was determined at harvest and berry weight was measured (Mettler Toledo PL602-S, Greifensee, Switzerland). Total soluble solids in grape must was determined by refractrometry (ATR ST Plus; Schmidt + Haensch, Berlin, Germany) according to the official methods of the International Organisation of Vine and Wine (OIV 1990).

Compound extraction and HPLC conditions for separating individual phenolic compounds. At harvest, 500 g healthy grapes from each experimental plot were collected. Subgroups of 50 berries were obtained in triplicate, weighed (Mettler Toledo PL602-S), and stored at -20°C until analysis. Berry skins were separated from pulp and seeds with a scalpel. Dried skins were frozen at -80°C and lyophilized to full dryness (Virtis Genesis 25LL lyophilizer; the Virtis Company, Gardiner, NY). Berry skins were weighed and homogenized in a 180W Moulinex grinder (Alençon, France). Phenolic compounds were extracted from 0.5 g homogeneous grape skin powder with 4 mL methanol/formic acid (95:5 v/v) and mixed 15 sec by Heidolph Reax control (Schwabach, Germany). After mixing, the solution was centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The supernatant was collected in a flask and refrigerated. The extraction was repeated until the supernatant was colorless. The combined supernatants were brought up to 50 mL with methanol:formic acid. The acid-alcohol extracts, previously filtered (0.25 µm diameter Chromafil filters, Düren, Germany), were analyzed by HPLC (1200 LC; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with a degasser, quaternary pump, column oven, 1290 infinity autosampler, UV-vis diode-array detector (DAD), fluorescence spectrophotometer detector (FLD), and the Chemstation software package for LC 3D systems (Agilent Technologies) to control the instrument and for data acquisition and data analysis.

The analysis was carried out as described (Gómez-Alonso et al. 2007) with slight modifications to improve peak resolution. For identification and quantification of compounds, 10 µL extract was injected directly into the HPLC. Absorbance at 280, 320, 360, and 520 nm was measured by the DAD detector and excitation at 280 and emission at 320 nm was measured by the FLD detector. Phenolic compounds were identified by their elution order and by comparison to the retention times of commercially available standards (catechin, epicatechin, catechin gallate, epicatechin gallate, myricetin, quercetin, and *trans*-resveratrol from Sigma (St. Louis, MO), malvidin-3-glucoside, procyanidins B1 and B2, quercetin, kaempferol and isorhamnetin glucosides, myricetin-3-glucoside, and kaempferol-3-rutinoside from Extrasynthese (Genay, France), quercetin-3-rutinoside, kaempferol, isorhamnetin, and quercetin-3-galactoside from Fluka (Buchs, Germany), and caffeic, coumaric, and ferulic acids from Merck (Darmstadt, Germany)). Quantification of non-commercial compounds was made using the calibration compound belonging to the same family which was next in the order of elution. Total polyphenols was given in mg/kg of malvidin-3-glucoside, myricetin-3-glucoside, catechin, and caffeic acid for anthocyanins, flavonols, flavanols, and hydroxycinnamic acids, respectively.

Total phenolic compounds were calculated from the sum of the concentrations (mg/kg berry fresh weight) of the individual compounds. The anthocyanins present in extracts were identified as the monoglucoside forms (3-glu) of delphinidin (*Dp*), cyanidin (*Cy*), petunidin (*Pt*), peonidin (*Pn*), and malvidin (*Mv*); the acetylglucoside forms (3-acglu) (*DpA*, *CyA*, *PtA*, *PnA*, and *MvA*), and the *p*-coumaroylglucoside forms (3-pcmglu) (*DpC*, *CyC*, *PtC*, *PnC*, and *MvC*). The flavanols identified were (+)-catechin (*CA*), (-)-epicatechin (*EC*), and procyanidins *B1*, *B2*, and *B3*. The flavonols identified were myricetin (*My*), quercetin (*Qc*), kaempferol (*Kp*), and isorhamnetin (*Ih*), their respective 3-glucosides (*MyG*, *QcG*, *KpG*, and *IhG*), 3-rutinosides of quercetin (*QcR*) and kaempferol (*KpR*), quercetin-3-glucuronide (*QcGR*), and quercetin-3-galactoside (*QcGL*). The hydroxycinnamic acids, hydroxycinnamoyltartaric acids, and stilbenes identified were caftaric, coutaric, and fertaric acids in their *cis* and *trans* isomers (*cCa* – *tCa*; *cCo* – *tCo*; *cFt* – *tFt*), caffeic (*CF*), coumaric (*COU*), and ferulic (*Fe*) acids, and *trans*-resveratrol (*tR*).

Statistical data analysis. Statistical comparisons between mean values were established with Student's *t* test using the SPSS version 13.0 for Windows statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results and Discussion

Weather conditions. The climate indices HI, CI, and DI did not vary strongly in 2009 and 2010 and showed a very dry viticultural climate defined by warm, temperate nights (Table 1). The 2010 season had slightly higher temperatures (2126.0°C day thermal integral versus 2037.6°C in 2009) and more rainfall (123.0 mm versus 101.8 in 2009). There were 41 days between the beginning of veraison and harvest in 2010, but only 30 in 2009, with a maximum daily temperature above 35°C. Daytime temperature above 35°C is detrimental to color in sensitive cultivars (Spayd et al. 2002). In warm years, the concentrations of compounds in Tempranillo grapes that are considered primitive pigments leading to formation of different anthocyanins are lower than in relatively cool years (Ryan and Revilla 2003).

Vine vegetative growth, yield, and classical parameters. Preflowering defoliation by removal of leaves from the seven basal nodes of the main shoots eliminated 36% of the vine LA

in 2009. In 2010, the intensity of this practice was increased with removal of leaves from secondary shoots, representing 50% of the vine LA (Table 2). Average total vine LA from veraison to harvest was significantly affected by defoliation only in 2009. Although more severe defoliation was applied in 2010, no differences in total LA were observed between control and defoliation vines. This response could be due to canopy management, since in this year the total LA of the control did not exceed 7.2 m²/vine, indicating a greater intensity of shoot topping, so the total LA was similar between treatments.

The influence of defoliation on yield components is shown (Table 2). Fruit set rates were not significantly affected by defoliation in 2009, while in the following season, defoliation reduced fruit set by a notable 36%. These results can be explained by the greater intensity of defoliation in 2010, when the main leaves of secondary shoots were also removed. Preflowering leaf removal had no effect on berry weight in either year. The effects of preflowering defoliation on yield were only significant in 2010, in which defoliation decreased yield. This yield reduction may be due to reduced fruit set in

Table 2 Influence of preflowering defoliation on vegetative growth and cluster and yield components.

Parameter	Treatment	2009	2010	Average
Leaf area removed (%)	C ^a	–	–	–
	ED	36.0	50.0	43.0
Total leaf area (m ² /vine)	C	9.1	7.1	8.1
	ED	7.2** ^b	6.7	6.9
Fruit set (%)	C	60.0	52.0	56.0
	ED	52.0	33.0*	42.5
Berry weight (g)	C	2.0	2.0	2.0
	ED	2.0	1.8	1.9
Yield (t/ha)	C	17	20.4	18.7
	ED	19.7	15.0*	17.4
Total soluble solids (Brix)	C	23.5	23.0	23.3
	ED	24.1	23.5	23.8
Date of harvest	C	01 Sept	13 Sept	
	ED	20 Aug	31 Aug	

^aTotal leaf area: Average from veraison to harvest. C, nondefoliated vines; ED, defoliation performed just before flowering.

^bWithin each column, * and ** indicate a significant difference among treatments (*n* = 4) at *p* < 0.05 and *p* < 0.01, respectively.

Table 1 Yearly meteorological data and bioclimatic indices of the experimental site in western Spain (Badajoz) in 2009 and 2010.

Index	2009		2010	
	Viticulture climate	Value	Viticulture climate	Value
HI: Heliothermal	Warm (HI+2)	2764	Warm (HI+2)	2836
CI: Night cold (°C)	Temperate nights (CI-1)	16.6	Temperate nights (CI-1)	17.2
DI: Dryness (mm)	Very dry (DI+2)	-197.7	Very dry (DI+2)	-178.2
Parameter	Seasonal	Annual	Seasonal	Annual
Max T (°C)	29.0	23.6	29.3	22.7
Mean T (°C)	21.2	16.6	21.6	16.3
Min T (°C)	13.3	9.8	13.9	10.2
Rainfall (mm)	101.8	515.4	123.0	739.8
Thermal integral	2037.6	2456.2	2126.0	2308.3

this season caused by defoliation. Similar effects on yield have been reported in Tempranillo (Tardáguila et al. 2012), Barbera, and Lambrusco (Poni et al. 2009), with slightly higher reductions in Pinot noir and Pinot gris (Sabbatini and Howell 2010).

Some studies also reported that early defoliation can increase sugar (Poni et al. 2006). Similar results were observed in our study. In both years, to obtain grapes with the same sugar concentration at harvest for both treatments, ED was harvested 12 days before C, and therefore had a greater sugar concentration at that time.

Grape berry skin total phenolic composition. Forty-two phenolic compounds were identified and quantified in Tempranillo grape skins, including anthocyanins, flavonols, simple and conjugated hydroxycinnamic acids, and flavanol monomers and dimers. The effects of defoliation on the different phenol families in both seasons are shown (Figure 1). Defoliation increased both total phenolic concentrations and the concentrations of individual phenolic families in both years. Enhanced exposure to sunlight due to basal leaf removal has been linked to improved grape quality, leading to fruit richer in soluble solids, anthocyanins, and phenols (Smart and Robinson 1991). In our study, the increase in phenols in ED was greater in 2010, with a significant increase in total flavonols (+87%) and total hydroxycinnamic acids (+42%). The effect of defoliation may be influenced by yearly weather conditions and cultivar (Bavaresco et al. 2008). In that study, genotype-environment interactions showed that in cool years, leaf removal improved ripeness of Barbera and Malvasia grape, while no effects were observed under warmer and drier conditions. In other cultivars such as Croatina, however, the opposite effect was observed. Under our experimental conditions, the defoliation effect on anthocyanin, hydroxycinnamic acid, and stilbene concentrations was most noticeable in dry years with lower HI and CI values, while the effect on flavanol concentration was most noticeable in wetter years, with higher HI and CI values.

Grape berry skin anthocyanin concentrations. The effect of defoliation anthocyanin compounds was studied during two vintages (Table 3). Fifteen compounds were identified, quantified, and grouped into monoglucosides, acetylglucosides, and coumaroylglucosides.

The anthocyanin profile was similar to that observed in other studies carried out with different clones of Tempranillo grapes (Revilla et al. 2009). Anthocyanin concentrations increased in berries of defoliated Pinot noir vines and remained unaltered or increased in other cultivars such as Merlot, Cabernet franc (Mazza et al. 1999), and Nebbiolo (Chorti et al. 2010).

In our study, a greater year effect than defoliation effect was observed on anthocyanin compounds. This situation could be due to weather differences between the seasons. In 2010, more anthocyanins were found than in 2009. These results are consistent with reports of higher concentrations of anthocyanins in warm, sunny years than in cool and rainy years (Diago et al. 2012a).

Mv and its derivatives were predominant, followed by *Dp* and its derivatives, while *Cy* and its derivatives were least abundant. Monoglucosides were not affected by defoliation in either year, although in both years the same trend was observed, with slightly increased *Dp*, *Pt*, and *Mv* monoglucosides and decreased *Cy* and *Pn* monoglucosides in defoliated treatments. Similar results were observed in Pinot noir grapevines, although there was no decrease in cyanidin accumulation (Sternad Lemut et al. 2013). These results could be explained by enhanced synthesis of trihydroxylated anthocyanins over dihydroxylated pigments in the presence of ultraviolet radiation (Cortell and Kennedy 2006).

Temperature and sunlight exposure affect synthesis of anthocyanin compounds in cool climates, where sun exposed and chilled to the temperature of shaded clusters tended to have the highest total monomeric skin anthocyanin concentrations (Spayd et al. 2002). In warm climates, high light exposure

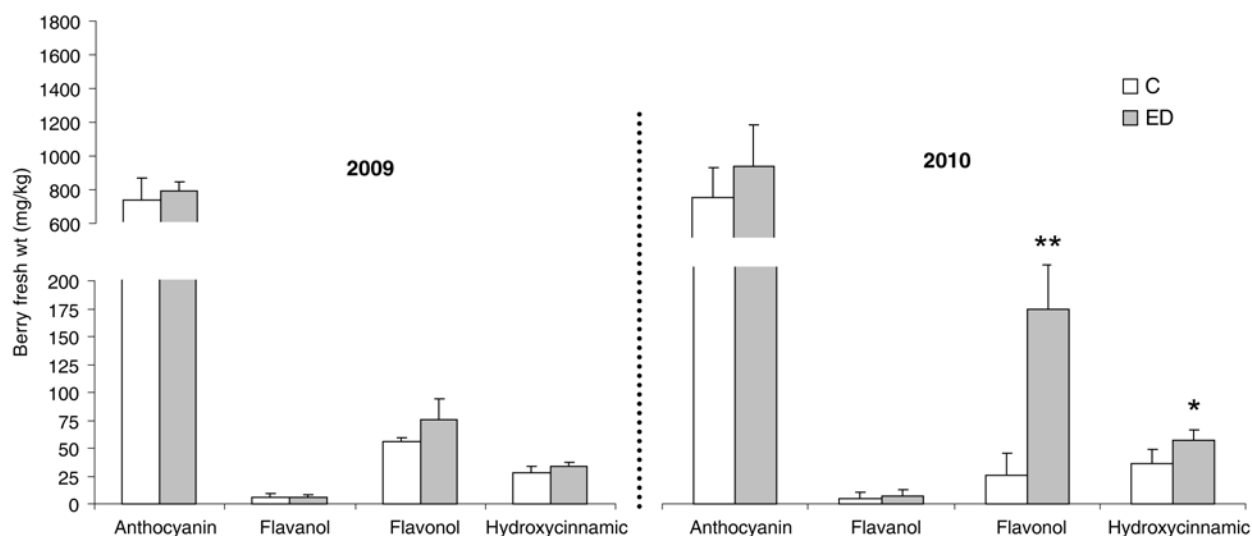


Figure 1 Effect of early defoliation on grape skin concentrations of total anthocyanins, flavanols, flavonols, and hydroxycinnamic acids. For each year and compound, * or ** indicate significant differences at $p < 0.05$ or $p < 0.01$, respectively. Vertical bars represent \pm SD. C, nondefoliated vines; ED, defoliation performed just before flowering.

can increase concentrations of anthocyanins, although if the berry temperature is too high, fruit quality can be adversely affected (Mori et al. 2007).

When the acetylglucosides were analyzed individually, early defoliation significantly increased *PtA* and *MvA* in 2009 by over 15%, while differences were not significant in 2010, although the same trend was observed in both seasons. Preflowering defoliation increased accumulation of coumaroylglucoside compounds, although this was only significant for *PtC* in 2009.

Table 3 Preflowering defoliation effects on grape skin anthocyanin concentrations (mg/kg berry fresh weight).

Compound ^a	Treatment ^b	2009	2010	Average
<i>Dp</i>	C	83.5	68.2	75.9
	ED	85.6	113	99.1
<i>Cy</i>	C	15.6	8.6	12.1
	ED	9.6	9.6	9.6
<i>Pt</i>	C	80	71	75.5
	ED	84.5	105	94.6
<i>Pn</i>	C	25.8	24.3	25.1
	ED	17.9	18.6	18.3
<i>Mv</i>	C	279	307	293
	ED	304	363	336
Σ Monoglucoside	C	483.9	479.1	481.6
	ED	501.6	609.2	557.6
<i>DpA</i>	C	3.9	4.5	4.2
	ED	4.4	6.5	5.45 ^{ac}
<i>CyA</i>	C	1.2	1.2	1.2
	ED	1.2	1.3	1.3
<i>PtA</i>	C	4.9	6.4	5.7
	ED	5.8*	8.5	7.2
<i>PnA</i>	C	0.8	0.9	0.9
	ED	0.8	1.2	1
<i>MvA</i>	C	23.7	35.9	29.8
	ED	28.6*	41.6	35.1
Σ Acetylglucoside	C	34.5	48.9	41.8
	ED	40.8*	59.1	50.0*
<i>DpC</i>	C	2	4.9	3.5
	ED	1.8	3.7	2.8
<i>CyC</i>	C	3.8	3.2	3.5
	ED	3.6	4.8	4.2
<i>PtC</i>	C	34.6	42.4	38.5
	ED	40.8*	54.2	47.5*
<i>PnC</i>	C	7.7	6.9	7.3
	ED	7.5	8.8	8.2
<i>MvC</i>	C	142	209	176
	ED	167	215	191
Σ Coumaroylglucoside	C	190.1	266.4	228.8
	ED	220.7*	286.5	253.7

^a*Dp*, delphinidin-3-glucoside; *Cy*, cyanidin-3-glucoside; *Pt*, petunidin-3-glucoside; *Pn*, peonidin-3-glucoside; *Mv*, malvidin-3-glucoside; *DpA*, delphinidin-3-glucoside acetate; *CyA*, cyanidin-3-glucoside acetate; *PtA*, petunidin-3-glucoside acetate; *PnA*, peonidin-3-glucoside acetate; *MvA*, malvidin-3-glucoside acetate; *DpC*, delphinidin-3-glucoside coumarate; *CyC*, cyanidin-3-glucoside coumarate; *PtC*, petunidin-3-glucoside coumarate; *PnC*, peonidin-3-glucoside coumarate; and *MvC*, malvidin-3-glucoside coumarate.

^bC, nondefoliated vines; ED, defoliation performed just before flowering.

^cWithin each column, * indicates a significant difference among treatments (n = 4) at p < 0.05.

The stability of *DpA* and *PtC* is greater as the number of methoxyl-B rings increases. Thus, *Mv* and *Pn* derivatives are more stable than *Dp*, *Cy*, and *Pt* because they lack *ortho*-positioned hydroxyl groups, which results in comparatively higher resistance to oxidation than *Dp*, *Cy*, and *Pt*, which have an *o*-diphenol structure on the B ring (He et al. 2010). Malvidin is also the reddest individual anthocyanidin (Jackson 2008). On the other hand, esterified coumaric acid derivatives are more stable than unesterified anthocyanins. Defoliation increased acetylated forms, although it was significant only in 2009. This is an interesting result because acylation of the sugar moiety in the anthocyanins can also favor chemical stability (Gueffroy et al. 1971).

Flavanol concentration in grape berry skins. The effect of early leaf removal on the flavanol concentrations in grape berry skin was also analyzed (Table 4). Independent of treatment and season, the predominant flavanols were *B1* and *B3*. In general, ED vines had more flavanols, although these differences were not significant in either year. In a study of flavanol accumulation in Pinot noir berries during development, similar results were reported early in the season but disappeared by harvest (Sternad Lemut et al. 2013). There was also a vintage effect on the concentrations of *B1* and *B3* (Table 4). These results agree with other studies in which grape skin flavanols are not influenced by light exposure (Downey et al. 2004).

Flavanol concentration in grape berry skins. Twelve flavanol compounds were identified and quantified in defoliated and control Tempranillo berry skins (Table 5). Defoliation increased the concentrations of nine flavanol compounds. This effect was greater in 2010 than in 2009. The flavanol profile was similar to that reported by others for Tempranillo (Hermosín-Gutiérrez et al. 2011), with quercetin- and myricetin-based flavanols, *MyG*, *QcG*, and *QcGR*, dominating. The effect of preflowering defoliation on flavanol concentration in berries differed slightly between seasons, although similar trends were observed. Leaf removal had a stronger effect in 2010, when flavanol concentrations significantly increased except for the aglycone forms. Flavanol concentrations have been enhanced by prebloom defoliation (Diago et al. 2012a).

Table 4 Preflowering defoliation effects on grape skin flavanol concentrations (mg/kg berry fresh weight).

Compound ^a	Treatment ^b	2009	2010	Average
<i>CA</i>	C	2.49	1.18	1.84
	ED	2.55	1.33	1.94
<i>EC</i>	C	0.58	0.24	0.41
	ED	0.51	0.57	0.54
<i>B1</i>	C	6.17	2.54	4.36
	ED	6.5	4.76	5.63
<i>B2</i>	C	0.4	0.35	0.38
	ED	0.39	0.55	0.47
<i>B3</i>	C	0.95	3.29	2.12
	ED	1.03	4.71	2.87

^a*CA*, (+)-catechin; *EC*, (-)-epicatechin; *B1*, procyanidin B1; *B2*, procyanidin B2; *B3*, procyanidin B3.

^bC, nondefoliated vines; ED, defoliation performed just before flowering.

The branch of the flavonoid pathway leading to flavonol biosynthesis is light-dependent, in contrast to anthocyanin and tannin synthesis, which are not greatly affected by shading (Downey et al. 2004). Sunlight favors the accumulation of flavonols in the berries (Spayd et al. 2002). Other authors report that the increase in flavonol synthesis is a consequence of higher radiation and sun exposure in the vineyard, because they are involved in UV screening (Downey et al. 2004, Giovanelli and Brenna 2007). This result should be highlighted because these compounds are directly involved in copigmentation and the stabilization of color in red wines (Boulton 2001, Spayd et al. 2002), which results in improved color density (Diago et al. 2012b). Several studies in model solutions identified flavonols as the best cofactors (Baranac et al. 1996). Among flavonols, quercetin produces strong copigmentation (Bakowska et al. 2003).

Hydroxycinnamic acid and stilbene concentrations in grape skins. The influence of early defoliation on the concentration of hydroxycinnamic acids (*CF*, *COU*, and *Fe*), hydroxycinnamoyltartaric acids (*Ca*, *Co*, and *Ft*), and stilbenes (*tR*) was determined in both seasons (Table 6). Four of these compounds increased significantly with early leaf removal (*tCa*,

tCo, *cFt*, and *tFt*). In 2009, defoliation significantly increased *tCo* by 32% and *COU* by 40%, while in 2010, no differences were observed. Total phenolic acid concentration was similar to that reported by other authors in Tempranillo, although differences were found in the relative proportions of individual acids (Gómez-Alonso et al. 2007, Diago et al. 2012b).

Hydroxycinnamic and hydroxycinnamoyltartaric acids can act as cofactors and enhance and stabilize anthocyanin (Markovic et al. 2000). These acids react with monomeric anthocyanins to form pyranoanthocyanins, which are more stable and thus stabilize wine color (Schwarz et al. 2003). Among the phenolic acids, ferulic acid exhibits strong color enhancement (Markovic et al. 2000). Thus, viticultural practices that increase the concentration of phenolic acids in the berry should be applied. Defoliation is a potentially useful practice because the concentration of some phenolic acids can increase. This is an interesting result, since several studies reported that the addition of caffeic and *p*-coumaric acids to musts before fermentation enhances intermolecular copigmentation in the resulting red wine (Bloonfield et al. 2003). This increase may be explained by higher canopy porosity and increased cluster exposure (Tardáguila et al. 2010), although the greatest effect was seen in 2010, possibly due to the previously discussed increased intensity of defoliation. Although increased color stability was seen, special attention must be paid during winemaking and storage because wines with high concentrations of hydroxycinnamic acids (especially *p*-coumaric and ferulic acid) can develop strong phenolic flavors

Table 5 Preflowering defoliation effects on skin flavonol concentrations (mg/kg berry fresh weight).

Compound ^a	Treatment ^b	2009	2010	Average
<i>My</i>	C	3.57	2.55	3.06
	ED	4.26 ^c	4.38	4.32*
<i>Qc</i>	C	0.12	0.09	0.11
	ED	0.12	0.23	0.16
<i>Kp</i>	C	0.13	0.05	0.09
	ED	0.20	0.04	0.12
<i>Ih</i>	C	0.16	0.12	0.14
	ED	0.16	0.10	0.13
<i>MyG</i>	C	24.20	7.83	16.02
	ED	29.54	42.36***	35.95**
<i>QcG</i>	C	5.17	1.44	3.31
	ED	7.33	31.31*	19.32*
<i>KpG</i>	C	1.04	0.41	0.73
	ED	1.93	7.30*	4.62*
<i>IhG</i>	C	3.64	2.27	2.96
	ED	4.24	8.63***	6.44**
<i>QcR</i>	C	0.20	0.23	0.22
	ED	0.54	3.54*	2.04*
<i>KpR</i>	C	0.46	0.39	0.43
	ED	0.75	2.18*	1.47
<i>QcGR</i>	C	10.75	5.37	8.06
	ED	18.18*	49.53***	33.86**
<i>QcGL</i>	C	0.70	0.22	0.46
	ED	1.42	5.90*	3.66*

^a*My*, myricetin; *Qc*, quercetin; *Kp*, kaempferol; *Ih*, isorhamnetin; *MyG*, myricetin-3-glucoside; *QcG*, quercetin-3-glucoside; *KpG*, kaempferol-3-glucoside; *IhG*, isorhamnetin-3-glucoside; *QcR*, quercetin-3-rutinoside; *KpR*, kaempferol-3-rutinoside; *QcGR*, quercetin-3-glucuronide; *QcGL*, quercetin-3-galactoside.

^bC, nondefoliated vines; ED, defoliation performed just before flowering.

^cWithin each column, *, **, and *** indicate a significant difference among treatments (n = 4) at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

Table 6 Preflowering defoliation effects on skin hydroxycinnamic acid and stilbene concentrations (mg/kg berry fresh weight).

Compound ^a	Treatment ^b	2009	2010	Average
<i>cCa</i>	C	0.03	0.00	0.02
	ED	0.06	0.00	0.03
<i>tCa</i>	C	3.25	2.26	2.76
	ED	3.65	3.94	3.80 ^c
<i>cCo</i>	C	1.59	1.25	1.42
	ED	1.02	0.86	0.94
<i>tCo</i>	C	0.82	0.52	0.67
	ED	1.21**	1.66	1.44**
<i>CF</i>	C	12.08	12.16	12.12
	ED	13.13	14.78	13.96
<i>COU</i>	C	2.13	9.26	5.70
	ED	3.59*	9.18	6.39
<i>cFt</i>	C	6.20	3.27	4.74
	ED	7.40	15.41	11.41**
<i>tFt</i>	C	2.02	1.69	1.86
	ED	2.75	7.85	5.30*
<i>Fe</i>	C	0.51	2.34	1.43
	ED	0.88	1.91	1.40
<i>tR</i>	C	0.90	1.32	1.11
	ED	0.97	2.26	1.62

^a*cCa*, *c*-caftaric acid; *tCa*, *t*-caftaric acid; *cCo*, *c*-cuotaric acid; *tCo*, *t*-cuotaric acid; *CF*, caffeic acid; *COU*, coumaric acid; *cFt*, *c*-fertaric acid; *tFt*, *t*-fertaric acid; *Fe*, ferulic acid; *tR*, *t*-resveratrol.

^bC, nondefoliated vines; ED, defoliation performed just before flowering.

^cWithin each column, * and ** indicate a significant difference among treatments (n = 4) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

in the presence of *Brettanomyces* yeasts through decarboxylation of hydroxystyrenes, which are subsequently reduced to ethyl phenols (Steinke and Paulson 1964). Precautions should therefore be taken to avoid the action of this microorganism where possible.

Conclusions

Preflowering defoliation advanced grape ripening by 12 days in both years studied. At harvest, concentrations of phenolic compounds in Tempranillo grape skins increased with early leaf removal. The different families of phenolic compounds responded differently to defoliation. The most noteworthy response to preflowering defoliation was a significant increase in flavanol concentrations. Flavanol concentrations, in contrast, were not modified by leaf removal.

The concentrations of total flavonols, hydroxycinnamic acids, hydroxycinnamoyltartaric acids, and *t*-resveratrol in grape skins increased in early defoliated vines, possibly due to enhanced synthesis under conditions of greater radiation and sun exposure. These results indicate that preflowering leaf removal could increase the concentrations of compounds involved in copigment reactions, which are crucial for wine color stability. However, the potential benefits of leaf removal treatments should be confirmed in wines made from these grapes.

Literature Cited

- Bakowska, A.B., A.Z. Kucharska, and J. Oszmianski. 2003. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chem.* 81:349-355.
- Baranac, J.M., N.A. Petranović, and J.M. Dimitrić-Marković. 1996. Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. *J. Agric. Food Chem.* 44:1333-1336.
- Bavaresco, L., M. Gatti, S. Pezzutto, M. Fregoni, and F. Mattivi. 2008. Effect of leaf removal on grape yield, berry composition, and stilbene concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* 59:292-298.
- Bloomfield, D.G., D.A. Heatherbell, and M.S. Pour Nikfardjam. 2003. Effect of *p*-coumaric acid on the color of red wine. *Mitt. Klosterneuburg* 53:195-198.
- Boulton, R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52:67-87.
- Chorti, E., S. Guidoni, A. Ferrandino, and V. Novello. 2010. Effect of different cluster sunlight exposure levels on ripening and anthocyanin accumulation in Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 61:23-30.
- Cortell, J.M., and J.A. Kennedy. 2006. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) Pinot noir fruit and extraction in a model system. *J. Agric. Food Chem.* 54:8510-8520.
- Diago, M.P., B. Ayestaran, Z. Guadalupe, S. Poni, and J. Tardaguila. 2012a. Impact of prebloom and fruit set basal leaf removal on the flavonol and anthocyanin composition of Tempranillo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 63:367-376.
- Diago, M.P., B. Ayestaran, Z. Guadalupe, A. Garrido, and J. Tardaguila. 2012b. Phenolic composition of Tempranillo wines following early defoliation on the vines. *J. Sci. Food Agric.* 92:925-934.
- Downey, M.O., J.S. Harvey, and S.P. Robinson. 2004. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10:55-73.
- Gatti M., F. Bernizzoni, S. Civardi, and S. Poni. 2012. Effects of cluster thinning and preflowering leaf removal on growth and grape composition in cv. Sangiovese. *Am. J. Enol. Vitic.* 63:325-332.
- Giovanelli, G., and O.V. Brenna. 2007. Evolution of some phenolic components, carotenoids and chlorophylls during ripening of three Italian grape varieties. *Eur. Food Res. Technol.* 225:145-150.
- Gómez-Alonso, S., E. García-Romero, and I. Hermosín-Gutiérrez. 2007. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *J. Food Comp. Anal.* 20:618-626.
- Gueffroy, D.E., R.E. Kepner, and A.D. Webb. 1971. Acylated anthocyanin pigments in *Vitis vinifera* grapes: Identification of malvidin-3-(6-*p*-coumaroyl) glucoside. *Phytochem.* 10:813-819.
- He, F., L. Mu, G.L. Yan, N.N. Liang, Q.H. Pan, J. Wang, M.J. Reeves, and C.Q. Duan. 2010. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules* 15:9057-9091.
- Hermosín-Gutiérrez I., N. Castillo-Muñoz, S. Gómez-Alonso, and E. García-Romero. 2011. Flavonol profiles for grape and wine authentication. In *Progress in Authentication of Food and Wine*. ACS Symposium series. S.E. Ebeler et al. (eds.), pp. 113-129. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Huglin, P. 1978. Nouveau mode d'évaluation des possibilités héliothermiques d'un milieu viticole. *C.R. Acad. Agric.* 64:1117-1126.
- Intrieri, C., I. Filippetti, G. Allegro, M. Centinari, and S. Poni. 2008. Early defoliation (hand vs. mechanical) for improved crop control and grape composition in Sangiovese (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* 14:25-32.
- Jackson, R.S. 2008. *Wine Science Principles and Applications*, 3rd ed. Academic Press, Burlington, MA.
- Lee J., and P.A. Skinkis. 2013. Oregon 'Pinot noir' grape anthocyanin enhancement by early leaf removal. *Food Chem.* 139:893-901.
- Markovic, J.M.D., N.A. Petranovic, and J.M. Baranac. 2000. A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids. *J. Agric. Food Chem.* 48:5530-5536.
- Mazza, G., L. Fukumoto, P. Delaquis, B. Girard, and B. Ewert. 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet franc, Merlot, and Pinot noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* 47:4009-4017.
- Mori, K., N. Goto-Yamamoto, M. Kitayama, and K. Hashizume. 2007. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J. Exp. Bot.* 58:1935-1945.
- O.I.V. 1990. *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vin et des moûts*. Office International de la Vigne et du Vin, Paris.
- Poni, S., L. Casalini, F. Bernizzoni, S. Civardi, and C. Intrieri. 2006. Effects of early defoliation on shoot photosynthesis, yield components, and grape composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:397-407.
- Poni, S., F. Bernizzoni, S. Civardi, and N. Libelli. 2009. Effects of pre-bloom leaf removal on growth of berry tissues and must composition in two red *Vitis vinifera* L. cultivars. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15:185-193.
- Revilla, E., E. García-Beneytez, and F. Cabello. 2009. Anthocyanin fingerprint of clones of Tempranillo grapes and wines made with them. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15:70-78.
- Riou, C. 1994. *Le Déterminisme Climatique de la Maturation du Raisin: Application au Zonage de la Teneur en Sucre dans la Communauté Européenne* (Rapport No. EUR-15863). Commission Européenne, Luxembourg.
- Risco, D., D. Pérez, A. Yeves, J.R. Castel, and D.S. Intrigliolo. 2014. Early defoliation in a temperate warm and semi-arid Tempranillo vineyard: Vine performance and grape composition. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20:111-122.
- Rustioni, L., D.R. Bedgood, O. Failla, P.D. Prenzler, and K. Robarbs. 2012. Copigmentation and anti-copigmentation in grape extracts studied by spectrophotometry and post-column-reaction HPLC. *Food Chem.* 132:2194-2201.

- Ryan, J.M., and E. Revilla. 2003. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* 51:3372-3378.
- Sabbatini, P., and G.S. Howell. 2010. Effects of early defoliation on yield, fruit composition, and harvest season cluster rot complex of grapevines. *HortScience* 45:1804-1808.
- Schwarz, M., T.C. Wabnitz, and P. Winterhalter. 2003. Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51:3682-3687.
- Smart, R., and M. Robinson. 1991. *Sunlight into Wine: A Handbook for Winegrape Canopy Management*. Winetitles, Adelaide, Australia.
- Spayd, S.E., J.M. Tarara, D.L. Mee, and J.C. Ferguson. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:171-182.
- Steinke, R.D., and M.C. Paulson. 1964. Phenols from grain, production of steam-volatile phenols during cooking and alcoholic fermentation of grain. *J. Agric. Food Chem.* 12:381-387.
- Sternad Lemut M., P. Sivilotti, P. Franceschi, R. Wehrens, and U. Vrhovsek. 2013. Use of metabolic profiling to study grape skin polyphenol behavior as a result of canopy microclimate manipulation in a 'Pinot noir' vineyard. *J. Agric. Food Chem.* 61:8976-8986.
- Tardáguila, J., F. Martínez de Toda, S. Poni, and M.P. Diago. 2010. Impact of early leaf removal on yield and fruit and wine composition of *Vitis vinifera* L. Graciano and Carignan. *Am. J. Enol. Vitic.* 61:372-381.
- Tardáguila, J., J.A. Blanco, S. Poni, and M.P. Diago. 2012. Mechanical yield regulation in winegrapes: Comparison of early defoliation and crop thinning. *Aust. J. Grape Wine Res.* 18:344-352.
- Tonietto, J., and A. Cabonneau. 2004. A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. *Agric. Forest Meteorol.* 124:81-97.
- Uriarte, D., et al. 2012. Early defoliation of 'Tempranillo' grapevines in semi-arid terroirs of Spain. *Acta Hortic.* 931:299-306.



Early leaf removal applied in warm climatic conditions: Impact on Tempranillo wine volatiles

Daniel Moreno^a, Esperanza Valdés^a, David Uriarte^b, Esther Gamero^a,
Inmaculada Talaverano^a, Mar Vilanova^{c,*}

^a Centro de Investigación Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), INTAEX, Ctra. de S. Vicente s/n, 06007 Badajoz, Spain

^b Centro de Investigación Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Finca la Orden, Ctra. A-V, Km 372, Guadajira, Badajoz, Spain

^c Misión Biológica de Galicia (CSIC), El Palacio-Salcedo, 36143 Pontevedra, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2016

Received in revised form 6 September 2016

Accepted 9 September 2016

Available online 10 September 2016

Keywords:

Defoliation

Volatile compounds

Odour activity value

Tempranillo

ABSTRACT

Defoliation is a cultural practice with demonstrated benefits in grape and wine quality. The objective of this study was to evaluate the effect of early leaf removal applied in warm climatic conditions on volatile composition of Tempranillo wines. During three consecutive vintages (2009–2011) wine volatile compounds (alcohols, C₆-compounds, ethyl esters, acetates, volatile acids, lactones and carbonyl compounds) from defoliated and non-defoliated vines were identified and quantified by GC–MS. Early leaf removal induced the increase of the concentration of all families of volatile compound quantified with exception of lactones. Significant increase was observed for 23 out of 34 volatile compounds analyzed. The vintage effect also was shown, where the highest effect of defoliation was exhibited in 2009 vintage. Principal component analysis (PCA) showed a good separation of defoliation, non-defoliation and vintage according to wine volatile composition. The analysis of odour activity value (OAV) exhibited an increase of fruity and floral odour on Tempranillo wines when early defoliation was applied.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aromatic composition has an important impact on grape and wine quality. In the last years have been demonstrated that modifications in the canopy management could be an important tool to improvement the aromatic grape quality.

Several works have shown management practices in the canopy increasing grape light exposure, has an important influence in the accumulation of secondary metabolites, like aroma compounds (Diago, Ayestarán, Guadalupe, Garrido, & Tardaguila, 2012; Poni, Casalini, Bernizzoni, Civardi, & Intrieri, 2006; Poni et al., 2013; Risco, Pérez, Yeves, Castel, & Intrigliolo, 2014). Leaf removal is usually applied on grapevines, whether manual or mechanical, from fruit set to veraison to improve light exposure, increase air circulation around the clusters penetration of fungicide sprays and decrease disease incidence, especially rot (Bledsoe, Kliewer, & Marois, 1988; Reynolds, Yerle, Watson, Price, & Wardle, 1996; Smart, 1985; Smart & Robinson, 1991). These effects were more pronounced in pre-bloom leaf-pulled vines than in those defoliated at fruit set (Vilanova, Diago, Genisheva, Oliveira, & Tardaguila, 2012). Poni et al. (2006) reported that defoliation near

bloom improved grape composition because controlled cropping of high-yielding cultivars by reducing fruit set.

Volatile composition of grapes is affected by this canopy manipulation increasing several free and bound compounds, important components of fruit quality (Jackson, 2000; Smith & Codrington, 1988; Zoecklein, Wolf, Marcy, & Jasinski, 1998). In this regard, several authors have shown the increased of volatile composition in different cultivars and wines like Gewürztraminer, Bachus, Pearl of Csaba, Schönbürger and Siegerrebe cultivars from Valley of British Columbia (Reynolds & Wardle, 1989), Muscat grape cultivars (Belancic et al., 1997), Riesling from Virginia (Zoecklein et al., 1998), Chardonnay Musqué from Ontario (Roberts, Reynolds, & De Savigny, 2007), Traminer from Indiana (Skinkis, Bordelon, & Butz, 2010), Tempranillo from La Rioja, Spain (Vilanova, Diago, et al., 2012) and Ciliegiole from Umbria region, Italy (Pallioti, Gardi, Berrios, Civardi, & Poni, 2012). Research performed by Ristic et al. (2007) established that bunch shading of Shiraz grapes decreased the levels of norisoprenoids in wine and other compounds may be altered inducing changes in wine aroma and flavor. Leaf removal in Sauvignon Blanc resulted in a greater reduction in vegetal aromas and flavors when is applied after fruit set, compared to veraison (Arnold & Bledsoe, 1990). It was described that early defoliation reduce berry weight and consequently fruit yield (Diago, Vilanova, & Tardaguila, 2010; Poni et al., 2006), whereas defoliation after veraison affects primary and secondary metabolite synthesis (Hunter & Visser, 1989;

* Corresponding author.

E-mail address: mvilanova@mbg.csic.es (M. Vilanova).

Zoecklein, Wolf, Duncan, Judge, & Cook, 1992; Zoecklein et al., 1998). Therefore, the lack of information on the effects of pre-bloom basal leaf removal on the wine volatile composition opens an important field of research.

In previous research we have studied the effects of the manual pre-flowering early defoliation on phenolic composition of Tempranillo grapes in the semi-arid *terroir* of western Spain (Moreno et al., 2015). The aim of the present study, as a continuation of previous studies, was to identify and quantify the main differences in volatile composition of Tempranillo wines affected by manual basal leaf removal at pre-flowering stage during three vintages (2009–2011).

2. Materials and methods

2.1. Experimental design and climatic conditions

This experiment was carried out in a *Vitis vinifera* L. cv Tempranillo vineyard located in Extremadura (western Spain) (lat. 38°51'N; long. 6°40'W; altitude 198 m) over the years 2009–2011. The vineyard was planted in 2001 on Richter 110 rootstock at a spacing of 2.5 by 1.2 m (3333 vines/ha). Row orientation was north-south and vines were trained to a bilateral cordon and vertical trellis. Vineyard soil had a silt-loam texture with 37.3% sand, 25.5% clay, 6.1% silt and 1.1% of organic matter (average depth 0.0–1.6 m).

The experimental design was a split-plot with four replicates by treatment accounted 108 plants per plot distributed in 18 plants across 6 rows. The experiment comprised 864 plants in total. The two treatments were: (a) manual leaf removal of the first seven basal leaves at pre-bloom, at stage 19 (Coombe, 1995) (ED) and control or non-defoliated (C). In 2010 and 2011 secondary shoots were also removed from ED vines. Drip irrigation was based on replacing 100% of crop evapotranspiration. Water consumption was calculated with a weighing lysimeter installed in the experimental vineyard. By the end of the season, the total applied irrigation was 666.6, 597.3 and 483.6 mm in 2009, 2010 and 2011, respectively.

The climate is continental semi-arid and annual rainfall is 351 mm, of which ~70% falls during dormancy. Climatic conditions were measured by an automatic meteorological station (CR10X datalogger; Campbell Scientific, Shepshed, UK) located in the plot. Rainfall registered from vegetative period (April–September) was 101.8, 123 and 150.4 mm for 2009, 2010 and 2011 respectively. The mean temperatures were 16.6, 16.3 and 16.4 °C for 2009, 2010 and 2011 respectively.

2.2. Agronomic determinations

The leaf area removed (LAR) was measured by LI-3000 area meter (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). The percentage of LAR represented 36%, 50% and 40% of the total leaf area at defoliation date in 2009, 2010 and 2011 respectively. In 2010 and 2011, the intensity of this practice was increased by removing of secondary shoots, if exist, from the first seven nodes from ED vines.

Vine total leaf area (TLA) was estimated using a plant canopy analyzer (LAI-2000; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) as described Moreno et al. (2015). TLA measured as the average from veraison to harvest shown 9.1 and 7.2 m²/vine for C and ED respectively in 2009 ($p < 0.05$), 7.1 and 6.7 m²/vine for C and ED respectively in 2010 ($p > 0.05$) and 11.1 and 8.7 m²/vine for C and ED respectively in 2011 ($p < 0.05$). In 2011 vine TLA was, for the same phenological stage, higher than in 2010, which explains the lower percentage of LAR.

Bloom stage was estimated from photographs of four clusters per vine for each experimental unit as described (Poni et al., 2006). Photographs were taken perpendicular to the cluster on a dark background just before anthesis and a linear regression between actual number of flowers and flowers counted in the digital photographs was used. The number of flowers per cluster was 349 and 341 for C and ED respectively

in 2009 ($p > 0.05$), 565 and 560 for C and ED respectively in 2010 ($p > 0.05$) and 712 and 599 for C and ED respectively in 2011 ($p < 0.05$).

At harvest, the percentage of fruit set was carried out by the ratio between the number of inflorescences, previously estimated, and the manual count of the total number of berries per cluster (Poni et al., 2006). Fruit set in 2009 was 60% and 52% for C and ED respectively ($p > 0.05$), in 2010 was 52% and 33% for C and ED respectively ($p < 0.05$) and in 2011 was 42 and 35% for C and ED respectively ($p > 0.05$) (Moreno et al., 2015).

2.3. Microvinifications, must and wine composition

Vines were manually harvested when total soluble solids concentration (TSS) reached 23–24 °Brix (common harvesting criterion for this variety in this area). According to that criterion, control vines were harvest at September 01st, September 13th and August 31st in 2009, 2010 and 2011 respectively, while ED vines were harvest at August 20th, 31st and 18th in 2009, 2010 and 2011 respectively. The grapes were transported to the Technological Institute of Food and Agriculture experimental winery from INTAEX. Must were analyzed for TSS, pH, titratable acidity (TA), malic acid and tartaric acid. Analysis for density, TSS, pH and TA was according to the official methods of the OIV (1990). Malic acid and tartaric acid were, respectively, analyzed enzymatically (European Commission 1990) and according to the Rebelein method Blouin (1972), using a multidetector Easyschem system (Systea S.p.a., Anagni, Italy). Yield weight at harvest was determined on ten marked vines per experimental plot.

The must from each experimental block was fermented in 50-L steel tanks at 22–24 °C. Total SO₂ was added to the musts at 50 mg/L and commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* Viniferm from Agrovín Company (Spain) was inoculated at 25 g/hL. Fermentation was monitored daily by measure of density and total phenolic index (TPI). The must were drawn off when a maximum in the TPI values was recorded during two consecutive days. Once fermentation was completed, the wines were settled at 4 °C and sulphur content was adjusted to 35 mg/L (as free SO₂). Finally, the wines were bottled and stored at 15 °C until analysis.

Wine analysis was carried out four months after bottling. Wine alcoholic degree (% v/v) was analyzed according to OIV methods (1990), pH, total acidity (TA), tartaric and malic acids were analyzed like musts determinations. Potassium was determined by an atomic absorption spectrophotometer (AA 240 FS, Varian, California, USA) by official method (OIV, 1990). All analyses were carried out in triplicate.

2.4. Wine volatile composition

In a 10 mL culture tube (Pyrex, ref. 1636/26MP), 8 mL of wine, 2.4 µg of internal standard (4-nonanol, Merck ref. 818773, Darmstadt, Germany) and a magnetic stir bar were added. Extraction of volatiles was done by stirring the sample with 400 mL of dichloromethane (Merck, ref. 1.06054; Darmstadt, Germany), according to the method of Oliveira, Fari, Sa, Barros, and Araujo (2006). After cooling at 0 °C for 10 min, the magnetic stir bar was removed and the organic phase was detached by centrifugation (RCF = 5118, 5 min, 4 °C) and the extract was recovered into a vial, using a Pasteur pipette. The aromatic extract (200 µg/L) was dried with anhydrous sodium sulphate (Merck, ref. 1.06649; Darmstadt, Germany) and placed in a new vial. Extractions of volatile compounds from each of the respective wines were performed in triplicate.

Gas chromatographic analysis of volatile compounds was performed using a GC–MS system constituted by an Agilent Technologies 6890N Chromatograph and an ion-trap mass spectrometer Agilent 5975C. A 1 µL injection was made into a capillary column, coated with CP-Wax 52 CB (50 m × 0.25 mm i.d., 0.2 µm film thickness, Chrompack). The temperature of the injector (7683) was programmed from 20 °C to 250 °C, at 180 °C min⁻¹. The oven temperature was held at 40 °C, for 5 min, then programmed to rise from 40 °C to 250 °C, at 3 °C min⁻¹,

then held 20 min at 250 °C and finally programmed to go from 250 °C to 255 °C at 1 °C min⁻¹. The carrier gas was helium N60 (Air Liquide) at 103 kPa, which corresponds to a linear speed of 180 cm/s at 150 °C and the split vent was set to 13 mL/min. Each 3 µL extract was injected in the splitless mode (vent time 15 s). The detector was set to electronic impact mode (70 eV), with an acquisition range from 29 to 360 *m/z*, and an acquisition rate of 610 ms.

Identification was performed using the free software Wsearch32 by comparing mass spectra and retention index with those of pure standard compounds and confirming these by GC–MS. All of the compounds were quantified as 4-nonanol equivalents.

2.5. Odour activity value

The odour activity value (OAV) was determined to evaluate the contribution of a chemical compound to the aroma of a wine. OAV > 1 indicates possible contribution to the wine aroma. This was calculated as the ratio between the concentration of the individual compound and the perception threshold found in the literature (Etiévant, 1991; Ferreira, Lopez, & Cacho, 2000; Francis & Newton, 2005; Vilanova, Genisheva, Bescansa, Masa, & Oliveira, 2009).

2.6. Statistical analyses

The data analyses were performed using XLstat-Pro (Addinsoft). The data were subjected to two-way ANOVA with interaction analysis (ANOVA). The mean differences between treatments by year were calculated according to the least significant difference from Fisher's test (LSD), with a confidence interval of 95%. Principal component analysis (PCA) was applied to the wine volatile families of compounds to study the possible grouping of the treatments.

3. Results and discussion

3.1. Influence of early defoliation on must and wine chemical composition

The values of musts chemical composition and yield from 2009 to 2011 vintages are reported in Table 1. Only yield was affected by early defoliation in all vintages studied where early defoliation exhibited in 2010 and 2011 a decreasing vs control. Furthermore, defoliation induced a reduction of the total leaf area (TLA) in 2009 and 2011 vintage, however the TLA/yield ratio only was altered in 2009 (Table 1). Previous studies have reported that grape composition is usually affected by this

ratio as more assimilates are available per gram of fruit (Poni et al., 2006; Poni, Bernizzoni, Civardi, & Libelli, 2009). The effect of leaf removal on yield is quite variable depending upon timing and severity. When defoliation is applied before flowering, the carbohydrate supply is reduced and consequently reduces yield (Hunter & Visser, 1990). In 2009 vintage, *Botrytis* rot decreased the yield in control vines at harvest (data not shown), therefore the defoliation results most effective for yield in 2010 and 2011 vintages because lack of *Botrytis* rot incidence was observed. Diago et al. (2010) reported that *Botrytis* rot incidence was significantly reduced when early leaf removal was applied to Tempranillo vineyard in La Rioja (North of Spain) because the reduction the number of berries per cluster.

ANOVA showed the vintage effect on total acidity and tartaric acid. However the interaction Tr * Year was only significant for yield, since the behavior between years was different between treatments. In 2009 vintage significant differences were shown for pH and malic acid in Tempranillo musts.

Table 2 shows the effect of the defoliation treatment on Tempranillo wine chemical composition. The result of analysis of variance revealed differences between defoliation and control treatments for alcohol content, total acidity, malic and tartaric acid. The vintage showed higher effect than the treatment since all parameters studied exhibited differences between treatments with exception tartaric acid. However the interaction Tr * Year was shown for alcohol, pH, TA, and malic acid. Early leaf removal led to wines of higher alcohol content and tartaric acid, lower TA and malic acid, whereas pH and potassium remained unaffected. Similar results were found by Verzena et al. (2016), showing higher ethanol wine content, when early defoliation was applied to Nero d'Avola cultivar.

These results may be due to increased light exposure induced by defoliation, related to improve grape quality (Mabrouk & Sinoquet, 1998; Crippen & Morrison, 1986) leading to obtain berries with higher TSS and lower TA and malic acid concentration (Dokoozlian & Kliewer, 1996; Poni et al., 2006; Smart, 1985). Similar results were also found by others authors in Tempranillo wines from La Rioja (North Spain) (Vilanova, Diago, et al., 2012) and Istrian Malvasia wines (Croatia) (Bubola, Persuric, Ganje, & Cossetto, 2009), where defoliation induced higher alcohol content as a result of higher sugar accumulation in grapes of these treatments. On the other hand early defoliation induced an advanced in grape ripening around 10–13 days in all years studied and this aspect means to be affecting to chemical composition.

When the analysis was performed by vintage, in 2009 an effect was exhibited for all parameters analyzed with exception of ethanol and

Table 1
Chemical composition of Tempranillo must before fermentation and yield from defoliation (ED) and control (C) treatments.

Year	Treatment	SST °Brix	pH	Titrateable acidity g/L tartaric acid	Malic acid g/L	Tartaric acid g/L	Yield t/ha	TLA m ² /vine	TLA/yield m ² /kg
2009	C	23.5	3.7	5.2	2.3	5.5	16.8	9.1	1.8
	ED	24.1	3.4*	4.8	1.7*	4.9	19.8*	7.2**	1.2*
2010	C	23.0	3.6	5.5	1.9	4.4	20.4	7.1	1.2
	ED	23.5	3.6	4.1	1.7	4.5	15.0*	6.7	1.5
2011	C	23.2	3.5	5.2	1.9	4.9	19.5	11.1	1.9
	ED	23.4	3.6	5.7	2.0	4.6	15.1*	8.7*	1.9
Average years	Treatment	SST °Brix	pH	Titrateable acidity g/L tartaric acid	Malic acid g/L	Tartaric acid g/L	Yield t/ha	TLA m ² /vine	TLA/yield m ² /kg
2009–2011	C	23.2	3.77	4.69	1.92	5.29	20.56	9.1	1.6
	ED	23.7	3.70	4.88	1.90	5.63	16.63	7.3	1.5
ANOVA	Treatment	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
Significance	Year	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	ns
	Tr * Y	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns

ns indicates no significant difference.

* Significance at *p* < 0.05.

** Significance at *p* < 0.01.

*** Significance at *p* < 0.001.

Table 2
Chemical composition of Tempranillo wines from defoliation (ED) and control (C) treatments.

Year	Treatment	Alcohol (% v/v)	pH	Titrateable acidity (g/L tartaric acid)	Malic acid (g/L)	Tartaric acid (g/L)	Potassium (g/L)
2009	C	13.2	3.8	5.6	1.4	2.2	1.3
	ED	13.4	3.7*	6.3*	2.0***	3.3**	1.2
2010	C	13.5	3.6	5.7	2.9	3.0	0.7
	ED	14.1	3.5	4.8**	1.6***	3.2	1.0*
2011	C	12.0	3.8	6.9	1.9	2.9	1.8
	ED	13.6**	4.0*	4.7*	2.1	3.1	1.8
Average years 2009–2011	Treatment	Alcohol (% v/v)	pH	Titrateable acidity (g/L tartaric acid)	Malic acid (g/L)	Tartaric acid (g/L)	Potassium (g/L)
	C	12.9	3.7	6.1	2.1	2.7	1.3
	ED	13.7	3.7	5.2	1.9	3.2	1.3
ANOVA Significance		Alcohol (% v/v)	pH	Titrateable acidity (g/L tartaric acid)	Malic acid (g/L)	Tartaric acid (g/L)	Potassium (g/L)
	Treatment	***	ns	**	**	**	ns
	Year	**	***	ns	***	**	***
	Tr * Y	*	*	**	***	ns	ns

ns indicates no significant difference.

* Significance at $p < 0.05$.

** Significance at $p < 0.01$.

*** Significance at $p < 0.001$.

potassium where all parameters increased in early defoliation treatment except for pH. In 2010 vintage, defoliation only affect to TA, malic acid and potassium, where defoliation induced the deceasing of TA and malic acid. In the last vintage (2011) early defoliation increased alcohol content, pH and decreased TA.

Results of study performed by Kozina, Karoglan, Herjavec, Jeromel, and Orlic (2008), indicate that basal leaf removal had different influence on the wine chemical composition and quality that depends upon the variety tested. In Sauvignon Blanc wines basal leaves removal significantly reduced tartaric and malic acid content and increased the content of free and bound monoterpenes.

3.2. Effect of early defoliation on wine volatile composition

Fig. 1 shows the effect of pre-bloom leaf removal on total volatile concentration of Tempranillo wine by vintages grouped by families: alcohols, C₆-compounds, ethyl esters, acetates, volatile acids, lactones and carbonyl compounds. In 2009 early leaf removal induced changes in the concentration of all families of volatile compound with exception lactones and carbonyl compounds, while in 2010 this change was only observed in acetates and carbonyl compounds. Alcohols, acetates, volatile acids, lactones and carbonyl compounds showed changes by early leaf removal in 2011. Several works showed that defoliation induced an increase of grape and wine volatile composition. Results from Reynolds and Wardle (1989) have concluded that basal leaf removal increased free volatiles in wines from Gewürztraminer grape cultivars.

In our study the effect of defoliation affects differently to different families of compounds studied. Alcohols, represented by 13 compounds, have shown differences between treatments in 2009 and 2011 vintages, where defoliation exhibited the highest concentration vs control. The effect of early leaf removal also was shown for C₆-compounds family only in 2009 vintage, where defoliation induced an increase of concentration, however did not affect to this concentration in 2010 and 2011 vintages. In contrast, Vilanova, Diago, et al. (2012) showed that early defoliation induced a significant reduction of C₆-compounds in Tempranillo wines from La Rioja.

The same behavior to C₆ alcohols was observed in ethyl esters, where early defoliation also induced an increase vs control in 2009 vintage. An increase also was observed in total acetates in all vintages studied and total volatile acids only in 2009 and 2011 vintages. The increase of acetates concentration when early defoliation was applied also was observed in Tempranillo wines from North of Spain (Vilanova, Diago, et al., 2012).

Different behavior was shown for lactones (represented by one compound) where Tempranillo wines from defoliation treatment

showed a decreased in 2010 and 2011 and it was not affected in 2009 vintage. Finally carbonyl compounds showed an opposite behavior among vintages, defoliation induced increases in 2010 and decrease in 2011.

In another work (Bubola et al., 2009), pre-bloom defoliation led to Istrian Malvasia wines with the highest concentrations of ethyl esters and higher alcohols than control wines, while wines from leaf removal at *véraison* had the lowest concentration of these compounds. The results obtained by Verzena et al. (2016) demonstrate that early leaf removal can be applied to improve wine quality (volatiles constituents) in the Mediterranean region.

These differences in volatile composition among treatments by year could be due to the fact that the samples collection data was different (at the same °Brix). Different data could affect to the berry secondary metabolism when sugar berry accumulation stops or slow down. Vilanova, Genisheva, Bescansa, Masa, and Oliveira (2012) have shown that the evolution of volatiles during ripening of grape juice was not proportional to the changes in sugar content, which shows that the technological and aromatic maturities did not occur at the same time. Torchio et al. (2016) used response surface methodology to assess the simultaneous effect of sampling time and berry density on the volatile composition of Moscato bianco, showing that some compounds were more influenced by the sampling date than the berry density. This work concluded the sampling strategy impacted strongly on the aroma quality of berries affecting differently to different families of volatile compounds.

The effect of defoliation may be influenced by yearly weather conditions (Bavaresco, Gatti, Pezzutto, Fregoni, & Mattivi, 2008). In our study volatiles could be affected by early leaf removal differently depending on meteorological conditions and cultivar. As it was shown in Moreno et al. (2015), comparison of climatic index found that day thermal integral was slightly lower in 2009 than in the subsequent seasons (2037.6 °C, 2126.0 °C and 2137.1 °C in 2009, 2010 and 2011 respectively). The time between veraison to harvest was 30, 41 and 27 days for 2009, 2010 and 2011 respectively.

Table 3 presents the influence of the early defoliation treatment on the individual volatile compounds quantified in Tempranillo wines, from three vintages 2009–2011 (expressed as µg/L), together with the ANOVA results for the factors treatment (Tr) and vintage (Y). Data in the Table 3 have been arranged into the seven chemical families: alcohols, C₆-compounds, ethyl esters, acetates, volatile acids, lactones and carbonyl compounds. Results of the ANOVA on average vintage 2009–2011 showed the effect “treatment” on 72.5% (25 out 34 compounds) of the volatiles identified and quantified. ED treatment led to wines with highest concentrations of significant volatile compounds except

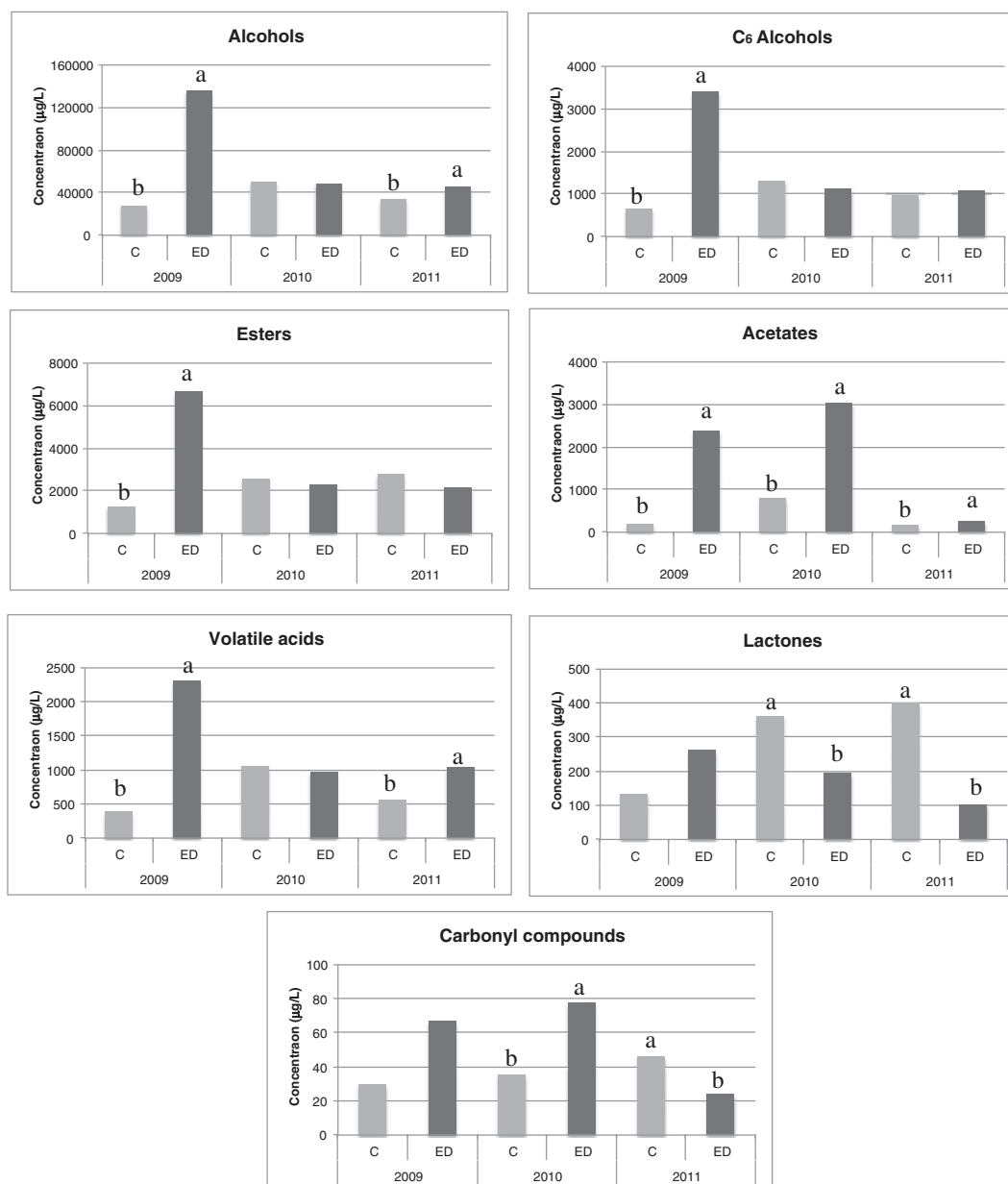


Fig. 1. Volatile composition (µg/L) in Tempranillo wines by vintages (2009–2011) from defoliation (ED) and control (C) treatments. Values with different letter in the same vintage indicate significant differences between treatments.

for *E*-3-hexanol and butyrolactone, which decreased when defoliation was applied. Year effect was slightly higher than treatment (76.5%; 26 compounds). The impact of leaf removal was higher in 2009 vintage, reaching the higher concentration of total volatile composition. The interaction $Tr * Y$ was significant for the concentrations of all compounds identified and quantified in Tempranillo wines with exception of 1-butanol.

The behavior of individual volatile compounds between treatments was different during the years of study. In general, the highest concentration of these compounds was found for the early defoliation treatment in 2009 vintage, where the intensity of defoliation was lower than 2010 and 2011 respect to total leaf area, because in 2010 and 2011 the secondary shoots were also removed from ED vines.

Alcohols were the largest group of volatile compounds accounting 13 compounds identified and quantified and >87% of the total volatile concentration in defoliation and control treatments, followed by ethyl esters. Isoamyl alcohols (2 + 3-methyl-1-butanol) and 2-phenylethanol exhibited the highest concentration of volatiles in

Tempranillo wines. The effect of pre-bloom defoliation lead wines with higher concentrations of 2 + 3-methyl-1-butanol in all years of study, however 2-phenylethanol only increased in 2009 vintage when ED was applied. The interannual average exhibited that both compounds showed significant differences intertreatments, vintages and $Tr * Y$.

Pre-bloom leaf removal induced the increase of 7 alcohols vs control (average 2009–2011), where 2009 vintage showed the highest increase for 11 of these substances. This behavior was not the same in 2010 and 2011 vintages showing interaction $Tr * Y$ in all alcohols with exception of 1-butanol. Zoecklein et al. (1998) found that leaf removal led to increased 2-phenylethanol and benzyl alcohol in wines from several white grape cultivars. Our results are in disagreement with other studies on Tempranillo wine from La Rioja, where these alcohols did not shown significant differences among defoliation treatments (Vilanova, Diago, et al., 2012).

The effects of pre-bloom basal leaf removal were mostly observed in the C₆-compounds. Among these compounds the highest concentration

Table 3

Volatile compounds in Tempranillo wines (2009–2011 vintages) from defoliation (ED) and control (C) treatments (concentration in µg/L).

Compounds (µg/L)	2009		2010		2011		2009–2011		Significance		
	C	ED	C	ED	C	ED	C	ED	Tr	Year	Tr * Y
Alcohols											
1-Propanol	683.24b	1835.34a	914.49	822.11	760.73	812.16	786.15	1156.54	*	*	**
2-Methyl-1-pentanol	63.96b	209.37a	123.27	113.47	38.50b	86.73a	75.24	136.52	**	**	**
2-Methyl-1-pentanol	948.82b	2669.01a	1984.87	1369.33	2082.25a	1422.75b	1671.98	1820.36	ns	ns	**
1-Butanol	54.17	121.2	81.22	72.63	62.25	66.44	65.88	86.76	**	ns	Ns
2 + 3-Methyl-1-butanol	15,771.49b	70,646.75a	27,453.44	27,698.82	17,483.92b	25,849.79a	20,236.28	41,398.45	**	**	**
4-Methyl-1-pentanol	10.56b	59.75a	26.93	22.24	16.37b	22.63a	17.96	34.87	*	**	***
3-Methyl-1-pentanol	18.87b	208.12a	44.46	43.17	16.02b	36.09a	26.45	95.80	***	***	***
1-Octen-3-ol	6.14b	22.63a	21.44	15.21	19.53a	12.89b	15.70	16.91	ns	ns	***
1-Heptanol	23.78b	115.91a	33.34	25.10	60.76a	21.49b	39.29	54.17	*	***	***
3,3-Butanediol	230.49b	589.98a	589.81a	421.88b	404.63a	310.43b	408.31	440.77	ns	*	**
Benzyl alcohol	21.55b	66.88a	32.99a	18.26b	83.66a	39.22b	46.07	41.45	ns	***	***
2-Phenylethanol	10,093.08b	58,987.18a	18,576.17	17,926.41	12,840.59b	16,909.02a	13,836.61	31,274.20	***	***	***
Methionol	39.96	40.49	88.43	57.37	35.71	66.44	54.70	54.77	ns	**	**
C₆ compounds											
1-Hexanol	566.83b	2896.84a	1190.09	952.43	858.22	967.60	871.71	1605.62	**	**	***
E-3-hexenol	3.04b	14.45a	24.60a	5.53b	7.48a	3.94b	11.71	7.97	**	***	***
E-2-hexenol	25.75b	65.83a	8.19	5.11	12.65a	5.51b	15.53	25.48	*	***	**
Z-3-hexenol	10.13b	57.49a	7.17b	31.93a	15.05b	24.99a	10.78	38.14	***	*	*
Z-2-hexenol	46.46b	356.48a	79.58	123.35	63.24b	82.53a	63.09	187.45	***	**	***
Ethyl acetates											
2-Phenylethyl acetate	18.21b	173.89a	60.24b	243.87a	38.71a	23.29b	39.06	147.02	***	***	***
Isoamyl acetate	180.52b	2202.41a	731.88b	2785.79a	119.02b	230.92a	343.81	1739.71	***	***	***
Ethyl esters											
Ethyl butanoate	247.58b	829.17a	515.91	624.59	439.99	473.34	401.16	642.36	*	ns	*
Ethyl hexanoate	115.21b	1234.06a	311.23	324.78	146.33b	428.53a	190.93	662.46	***	***	***
Ethyl octanoate	13.14b	281.78a	64.01	68.03	14.88b	79.43a	30.68	143.08	***	***	***
Ethyl succinate	740.24b	3719.01a	1010.88	840.24	1793.26a	877.99b	1181.46	1812.41	***	**	**
Ethyl lactate	108.33b	507.66a	586.12b	373.98a	286.26	254.52	326.90	378.72	ns	**	***
Diethyl malate	28.45b	107.99a	89.77b	44.75a	98.34a	24.89b	72.19	59.21	ns	ns	***
Volatile acids											
Isobutyric acid	30.70b	85.13a	70.54	68.05	68.14	62.84	56.46	72.00	ns	ns	*
Butyric acid	13.87b	67.52a	31.22	24.77	15.08b	24.17a	20.06	38.82	**	*	**
2-Methyl-butyric acid	58.21b	248.21a	108.53	118.42	98.46	109.10	88.40	158.57	**	ns	**
Hexanoic acid	153.07b	1026.19a	393.94	369.35	193.38b	379.43a	246.80	591.66	***	*	***
Octanoic acid	87.15b	651.97a	328.03	287.85	103.77b	375.40a	172.98	438.40	***	***	***
Hexadecanoic acid	40.94b	234.32a	125.30	106.39	79.52	81.43	81.92	140.71	**	ns	**
Other compounds											
Butyrolactone	133.65b	263.83 a	360.97	194.76	400.39a	103.87b	298.33	187.49	***	*	***
Acetoin	29.51b	67.13a	35.46	77.67	46.14a	23.84b	37.04	56.21	**	*	**

Values followed by different letters indicate the existence of significant differences between treatments ($p < 0.05$).

ns indicates no significant difference.

* Significance at $p < 0.05$.** Significance at $p < 0.01$.*** Significance at $p < 0.001$.

in Tempranillo wines was observed for 1-hexanol. For the mean of the three vintages, all compounds identified and quantified, with exception E-3-hexanol, exhibited higher concentration in defoliation treatments vs control. In 2009, pre-bloom leaf removal induced the increase of all C₆-compounds. However E-3-hexenol and E-2-hexenol decreases in 2010 and 2011 vintages when defoliation was applied. The alcohols with six carbon-atoms, hexenols and hexanols, supply vegetal and herbaceous nuances to the wine (Vilanova et al., 2015). In this regard, Arnold and Bledsoe (1990) found that later leaf removal was less effective in reducing the intensity of vegetal aromas than earlier defoliation (Tardaguila, Diago, Martínez-de Toda, Poni, & Vilanova, 2008). In our study the increase of C₆-compounds in ED for 2009 vintage could be due to the leaf area removed (%) was lower in 2009 (36%) than 2010 and 2011 (50% and 40% respectively) in this treatment (data shown in Moreno et al., 2015).

With regard to acetates, our results were similar to found in Tempranillo wines from la Rioja where the effect of early defoliation applied at pre-bloom increased the acetates in wines (Vilanova, Diago, et al., 2012). Isoamyl acetate was affected by early leaf removal in all vintages, increasing the concentration. Bubola et al. (2009) observed

similar results when compared pre-bloom, after-bloom and veraison defoliation in Istrian Malvasia wines aromatic composition. In this study pre-bloom leaf removal reached the highest concentration of isoamyl acetate.

Pre-bloom leaf removal, once again, exhibited influence on ethyl esters and volatile fatty acids, where early defoliation induces the increase of 9 from 12 of these compounds (2009–2011 average). In all vintages defoliation increased volatile fatty acids and ethyl esters and this increase was higher in 2009 vintage. However, this behavior was not shown for other esters in 2010 and 2011 vintages. Ethyl succinate, the main ethyl ester in Tempranillo wines, showed an opposite behavior and it was not affected by defoliation in 2010.

In our study it was observed that defoliation vines induced the decreasing of butyrolactone in Tempranillo wines from 2010 and 2011 vintages, where defoliation treatment results most effective against Botrytis. In 2009, the first vintage of defoliation, affected by Botrytis rot, showed the highest values of butyrolactone due to minor effect of defoliation. The mean of 2009–2011 vintages showed the highest concentration de butyrolactone in control treatments. Numerous studies have correlated lactones with the aroma of botrytized wines from

Sauternes (Bailly, Jerkovic, Meurée, Timmermans, & Collin, 2009), Barsac, Loupiac (Sarrazin, Dubourdieu, & Darriet, 2007), Campania (sweet Fiano wines) (Genovese, Gambuti, Piombino, & Moio, 2007) and Hungary (Tokaji Aszú) (Miklósy & Kerényi, 2004).

Another volatile compound involved in the aroma of the wine is acetoin, which is present in amounts ranging from 2 to 32 g/L. In contrast with *Saccharomyces cerevisiae* strain, non-*Saccharomyces* species are high producers of acetoin (Romano & Suzzi, 1993; Romano, Fiore, Paraggio, Caruso, & Capece, 2003). In our study early defoliation induced an increasing of acetoin concentration (mean of vintages). The analysis by vintage showed an increase of acetoin concentration in 2009 when ED was applied, however in 2011 ED induced a decreasing of this compounds. In 2009 vintage, defoliation not affected to the concentration of this compound.

On the other hand, all volatiles analyzed, with exception 1-butanol, showed the interaction treatment * year, since the behavior between years was different between treatments. This situation could be explaining by the climatic conditions and the *Botrytis* rot attack in 2009 vintage.

3.3. Principal components analysis (PCA) applied on wine volatile composition

With the aim of better interpreting the results, principal components analysis (PCA) was performed on the Tempranillo wines volatile concentration by vintages (Fig. 2). The two principal components (PC1 and PC2) accounted for 88.52% of the total variance (71.56% and 16.97% respectively). PC1 was characterized by the major contribution from carbonyl compounds, esters, acetates, C₆-alcohols, volatile acids and alcohols on the positive loading, while PC2 was only characterized by lactones in the positive side.

PCA shows clarity three groups, a first group sited in positive side of PC1, and formed by wines from early defoliation from 2009 and 2010 vintages. A second group formed by control from 2010 and 2011 vintages sited in the positive side of PC2, and the third that included wines from control-2009 and defoliated-2011 vintages located on negative side of the PC1 and PC2.

Higher differences between treatments were observed in 2009 vintage (drier pre-veraison stage), where wine from defoliation treatment showed a higher concentration of all compounds, except for lactones. In 2010 (116 mm of rainfall during pre-veraison period), these differences were lower, while in 2011, with wettest pre-veraison stage (122 mm) the differences between treatments were due mainly lactones.

3.4. Odour activity values of Tempranillo wines

In order to know the influence of volatile compounds quantified in the aroma perception, the odour activity value (OAV) as mean of 2009 and 2011 vintages, was calculated as the ratio of the concentration of each compound and its perception threshold. Results in Table 4 show that 8 out of 34 quantified volatile compounds in Tempranillo wines reached a concentration above the odour threshold (OAV > 1). Tempranillo wines from early defoliation vines showed the highest OAV for all volatile compound with significant differences between treatments vs control, accounted a total OAV of 175.88 for defoliation vs 56.23 for control.

The highest OAV for wines from early defoliation treatment, were exhibited by isoamyl acetate (banana), ethyl hexanoate (fruity), ethyl butanoate and ethyl octanoate (apple aroma). The application of manual defoliation in vines at pre-bloom had also shown the highest OAV of ethyl octanoate in Tempranillo wine for La Rioja (Vilanova, Diago, et al., 2012). The analysis of odour activity value (OAV) showed that fruit compounds were found above their odour thresholds in the wines and therefore it was observed an increase of fruity odour on Tempranillo wines when defoliation was applied. Furthermore the combination of the increase in ethyl octanoate, ethyl butanoate, ethyl hexanoate and isoamyl acetate may have contributed to the overall fruity aroma increase in that treatment. However all the green aroma compounds were found to be below their odour threshold levels in all wines. Similar results were found in Pinot noir wines when defoliation was applied in vines (Kemp, Harrison, & Creasy, 2010).

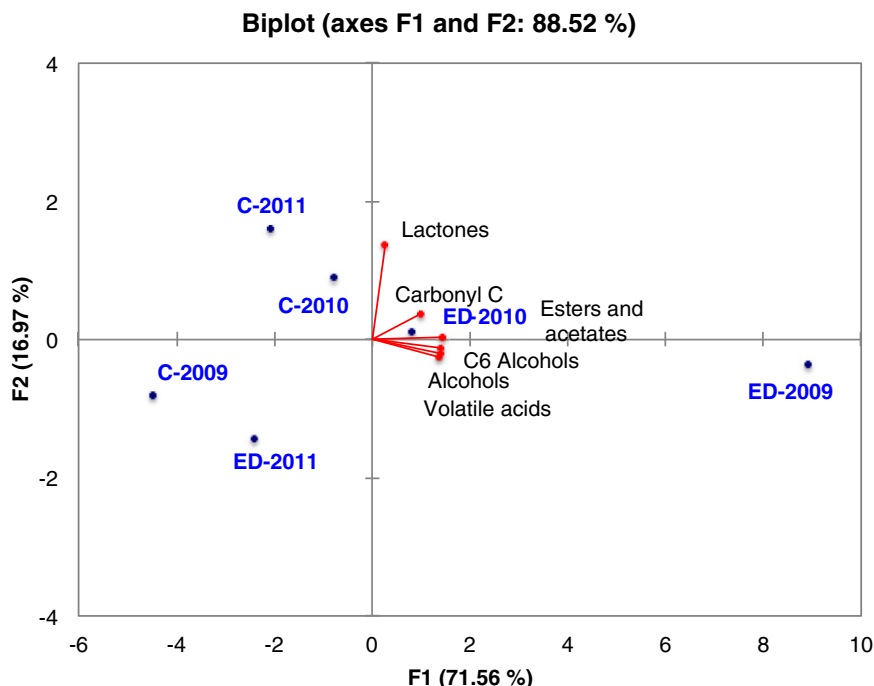


Fig. 2. Principal components analysis on volatile families of compounds in Tempranillo wines in basis to defoliation (ED) and control (C) treatments (2009–2011 vintages).

Table 4

Odour activity values (OAV) in Tempranillo wines (average of 2009–2011 vintages) from defoliation (ED) and control (C) treatments.

Compounds (μg/L)	Threshold (μg/L)	Descriptor	C	ED
2 + 3-Methyl-1-butanol	30,000	Alcohol, solvent	0.67	1.38
2-Phenylethanol	14,000	Rose, honey	0.99	2.23
Ethyl octanoate	5	Apple	6.14	28.62
Ethyl butanoate	20	Apple	20.06	32.12
Ethyl hexanoate	14	Fruity, apple	13.64	47.32
Isoamyl acetate	30	Banana	11.46	57.99
2-Methyl-butanoic acid	33	Cheesy	2.68	4.81
Hexanoic acid	420	Sweaty, cheesy	0.59	1.41

Descriptor and flavor thresholds of volatile compound found in the literature (Etiévant, 1991; Ferreira et al., 2000; Francis & Newton, 2005; Vilanova et al., 2009).

4. Conclusions

The effect of early defoliation on chemical and volatile composition of Tempranillo wines was studied during three consecutive vintages. Defoliation at pre-flowering stage led to wines of higher alcohol content and tartaric acid and lower titratable acidity and malic acid, whereas pH and potassium remained unaffected. Change in volatile composition of wines was also observed when defoliation was applied. Early leaf removal induced the increase of concentration of all families of volatile compound quantified with exception of lactones. The vintage showed influence on 76.5% of volatile compounds analyzed, being higher than treatment effect (72.5%). Respect to odour activity value analysis (OAV), early defoliation produced an increases of volatile compounds with threshold > 1. Improvement of fruity and floral odour on Tempranillo wines was observed when early defoliation was applied, however the sensibility of this management practice depending on year.

Acknowledgements

This research was supported by funds from INIA-FEDER (RTA2008-0037-C04) and Hortofruenol Research Group (AGA 002) (Consejería de Economía e Infraestructuras, Junta de Extremadura, Spain). D. Moreno is grateful to the Extremadura Government and European Regional Development Fund (ERDF). I. Talaverano acknowledges the financial support from Junta of Extremadura and INIA-Spain (BOE no. 259, October 27, 2012). Thanks to Dr. Manuel Marcos from CACTI (Vigo University).

References

- Arnold, R., & Bledsoe, A. (1990). The effect of various leaf removal treatments on the aroma and flavour of Sauvignon Blanc wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 74–76.
- Bailly, S., Jerkovic, V., Meurée, A., Timmermans, A., & Collin, S. (2009). Fate of key odorants in sauternes wines through aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8557–8563.
- Bavaresco, L., Gatti, M., Pezzutto, S., Fregoni, M., & Mattivi, F. (2008). Effect of leaf removal on grape yield, berry composition, and stilbene concentration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, 292–298.
- Belancic, A., Agosin, E., Ibacache, A., Bordeu, E., Baumes, R., Razungles, A., & Bayonove, C. (1997). Influence of sun exposure on the aromatic composition of Chilean Muscat grape cultivars Moscatel de Alejandria and Moscatel rosado. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 181–186.
- Bledsoe, A. M., Kliever, W. M., & Marois, J. J. (1988). Effects of timing and severity of leaf removal on yield and fruit composition of Sauvignon Blanc grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 49–54.
- Blouin, J. (1972). *Manuel pratique d'analyses des moûts et des vins*. Bordeaux: Fédération des CEIOE Gironde.
- Bubola, M., Persuric, D., Ganie, K. K., & Cossetto, M. (2009). Influence of timing and intensity of basal leaf removal on aromatic composition of cv. Istrian Malvasia wines (pp. 64–65). Abstracts Book III Int. Symp. 'Malvasias', Canary Islands.
- Coombe, B. G. (1995). Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1, 104–110.
- Crippen, D. D., & Morrison, J. (1986). The effects of sun exposure on the compositional development of Cabernet Sauvignon berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 235–242.

- Diago, M. P., Vilanova, M., & Tardaguila, J. (2010). Effects of timing of manual and mechanical early defoliation on the aroma of *Vitis vinifera* L. Tempranillo wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 382–391.
- Diago, M. P., Ayestarán, B., Guadalupe, Z., Garrido, A., & Tardaguila, J. (2012). Phenolic composition of Tempranillo wines following early defoliation of the vines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(4), 925–934.
- Dokoozlian, N., & Kliever, W. M. (1996). Influence of light on the grape berry growth and composition varies during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(5), 869–874.
- Etiévant, P. X. (1991). Wine. In H. Maarse (Ed.), *Volatile compounds in food*. Food Science and Technology. (pp. 483–546). New York: Marcel Dekker Inc.
- Ferreira, V., Lopez, R., & Cacho, J. F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1659–1667.
- Francis, I., & Newton, J. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 114–126.
- Genovese, A., Gambuti, A., Piombino, P., & Moio, L. (2007). Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine. *Food Chemistry*, 103, 1228–1236.
- Hunter, J. J., & Visser, J. H. (1989). The effect of partial defoliation, leaf position and developmental stage of the vine on leaf chlorophyll concentration in relation to the photosynthetic activity and light intensity in the canopy of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 10, 67–73.
- Hunter, J. J., & Visser, J. H. (1990). The effect of partial defoliation on growth characteristics of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon II. Reproductive growth. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 11(1), 26–32.
- Jackson, S. R. (2000). *Wine science*. San Diego, USA: Academic Press.
- Kemp, B., Harrison, R., & Creasy, G. L. (2010). The effect of timing of mechanical leaf removal on Pinot noir berry and wine composition. Proceedings of 7th International Cool Climate Symposium, Seattle, Washington, USA.
- Kozina, B., Karoglan, M., Herjavec, S., Jeromel, A., & Orlic, S. (2008). Influence of basal leaf removal on the chemical composition of Sauvignon Blanc and Riesling wines. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 6(1), 28–33.
- Mabrouk, H., & Sinoquet, H. (1998). Indices of light microclimate and canopy structure of grapevine determined by 3D digitising and image analysis, and their relationship to grape quality. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4, 2–13.
- Miklós, E., & Kerényi, Z. (2004). Comparison of the volatile aroma components in noble rotted grape berries from two different locations of the Tokaj wine district in Hungary. *Analytical Chemical Acta*, 513, 177–181.
- Moreno, D., Vilanova, M., Gamero, E., Talaverano, I., Intrigliolo, D., Uriarte, D., & Valdés, M. E. (2015). Effects of early leaf removal on the skin phenolic composition of cv. Tempranillo in semi-arid terroir of West Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66, 204–211.
- OIV (1990). *Recueil des Methodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts*. Paris: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin.
- Oliveira, J. M., Fari, M., Sa, F., Barros, F., & Araujo, I. M. (2006). C6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *Analytical Chemical Acta*, 563, 300–309.
- Pallioti, A., Gardi, T., Berrios, J. G., Civardi, S., & Poni, S. (2012). Early source limitation as a tool for yield control and wine quality improvement in a high-yielding red *Vitis vinifera* L. cultivar. *Scientia Horticulturae*, 145, 10–16.
- Poni, S., Casalini, L., Bernizzoni, F., Civardi, S., & Intrieri, C. (2006). Effects of early defoliation on shoot photosynthesis, yield components, and grape composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 397–407.
- Poni, S., Bernizzoni, F., Civardi, S., & Libelli, N. (2009). Effects of pre-bloom leaf removal on growth of berry tissues and must composition in two red *Vitis vinifera* L. cultivars. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15, 185–193.
- Poni, S., Gatti, M., Bernizzoni, F., Civardi, S., Bobeica, N., Magnanini, E., & Pallioti, A. (2013). Late leaf removal aimed at delaying ripening in cv. Sangiovese: Physiological assessment and vine performance. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19, 378–387.
- Reynolds, A. G., & Wardle, D. A. (1989). Influence of fruit microclimate on monoterpenes levels of Gewürztraminer. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 149–154.
- Reynolds, A. G., Yerle, S., Watson, B., Price, S. F., & Wardle, D. A. (1996). Fruit environment and crop level effects on Pinot Noir. III. Composition and descriptive analysis of Oregon and British Columbia wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 329–339.
- Risco, D., Pérez, D., Yeves, A., Castel, J. R., & Intrigliolo, D. S. (2014). Early defoliation in a temperate warm and semi-arid Tempranillo vineyard: Vine performance and grape composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20, 111–122.
- Ristic, R., Downey, M., Iland, P., Bindon, K., Francis, L., Herderich, M., & Robinson, S. (2007). Exclusion of sunlight from Shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13, 53–65.
- Roberts, R. W., Reynolds, A. G., & De Savigny, C. (2007). Composition and wine sensory attributes of Chardonnay Musqué from different viticultural treatments. *International Journal of Fruit Sciences*, 7(2), 57–83.
- Romano, P., & Suzzi, G. (1993). Acetoin production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 108(1), 23–26.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 169–180.
- Sarrazin, E., Dubourdieu, D., & Darriet, P. (2007). Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chemistry*, 103, 536–545.
- Skinkis, P., Bordonel, B., & Butz, E. (2010). Effects of sunlight exposure on berry and wine monoterpenes and sensory characteristics of Traminer. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 61, 147–156.

- Smart, R. (1985). Principles of grapevine canopy microclimate manipulation with implications for yield and quality. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 36, 230–239.
- Smart, R., & Robinson, M. (1991). *Sunlight into wine*. Ashford, South Australia: Winetitles Ltd.
- Smith, S., & Codrington, C. (1988). In R. Smart, R. Thornton, S. Rodriguez, & J. Young (Eds.), *Viticultural and oenological implications of leaf removal for New Zealand vineyards* (pp. 127–133) Proc. Sec. Intl. Symp. Cool Climate Vitic. Oenol, Auckland, New Zealand.
- Tardaguila, J., Diago, M., Martínez-de Toda, F., Poni, S., & Vilanova, M. (2008). Effects of timing of leaf removal on yield, berry maturity, wine composition and sensory properties of CV. Grenache grown under non-irrigated conditions. *International Journal of the Sciences de la Vigne et du Vin*, 42, 221–229.
- Torchio, F., Giacosa, S., Vilanova, M., Río, S., Gerbi, V., & Rolfe, L. (2016). Use of the response surface methodology for the assessment of changes in the volatile composition of Moscato Bianco (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Food Chemistry*, 212, 576–584.
- Verzena, A., Tripodi, G., Dima, G., Condurso, C., Scacco, A., Cincotta, F., ... Sparacio, A. (2016). Leaf removal and wine composition of *Vitis vinifera* L. cv. Nero d'Avola: The volatile aroma constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 150–159.
- Vilanova, M., Genisheva, Z., Bescansa, L., Masa, A., & Oliveira, J. M. (2009). Volatile composition of wines from *Vitis vinifera* Agudelo, Serradelo and Blanco lexítimo from Betanzos (NW Spain). *Journal of the Institute of Brewing*, 115, 35–40.
- Vilanova, M., Diago, M. P., Genisheva, Z., Oliveira, J. M., & Tardaguila, J. (2012). Early leaf removal impact on volatile composition of Tempranillo wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 935–942.
- Vilanova, M., Genisheva, Z., Bescansa, L., Masa, A., & Oliveira, J. M. (2012). Changes in free and bound fractions of aroma compounds of four *Vitis vinifera* cultivars at the last ripening stages. *Phytochemistry*, 74, 196–205.
- Vilanova, M., Rodríguez, I., Canosa, P., Otero, I., Gamero, E., Moreno, D., ... Valdés, E. (2015). Variability in chemical composition of *Vitis vinifera* cv Mencía from different geographic areas and vintages in Ribeira Sacra (NW Spain). *Food Chemistry*, 169(15), 187–196.
- Zoecklein, B. W., Wolf, T. K., Duncan, N. W., Judge, J. M., & Cook, M. K. (1992). Effects of fruit zone leaf removal on yield, fruit composition, and fruit rot incidence of Chardonnay and White Riesling (*Vitis vinifera* L.) grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 139–148.
- Zoecklein, B. W., Wolf, T. K., Marcy, J. E., & Jasinski, Y. (1998). Effect of fruit zone leaf thinning on total glycosides and selected aglycone concentrations of Riesling (*Vitis vinifera* L.) grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 35–46.